PRAVILNIK

O METODAMA ISPITIVANJA OPASNIH SVOJSTAVA HEMIKALIJA

("Sl. glasnik RS", br. 117/2013)

**Član 1**

Ovim pravilnikom propisuju se metode ispitivanja opasnih svojstava hemikalija.

**Član 2**

Metode ispitivanja fizičkih i hemijskih svojstava hemikalija date su u Prilogu 1.

Metode ispitivanja svojstava hemikalija koja utiču na život i zdravlje ljudi date su u Prilogu 2.

Metode ispitivanja svojstava hemikalija koja utiču na životnu sredinu date su u Prilogu 3.

Prilozi 1, 2. i 3. čine sastavni deo ovog pravilnika.

**Član 3**

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaje da važi Pravilnik o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija ("Službeni glasnik RS", broj 42/11).

**Član 4**

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku Republike Srbije".

**Prilog 1.**

**Metode ispitivanja fizičkih i hemijskih svojstava hemikalija**

**A.1. TEMPERATURA TOPLJENJA / MRŽNJENJA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Većina opisanih metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**. Osnovni principi metode dati su u literaturi**2, 3**.

*1.1. UVOD*

Opisane metode i uređaji primenjuju se za određivanje temperature topljenja supstanci, bez ograničenja u pogledu stepena čistoće.

Izbor metode zavisi od prirode supstance koja se ispituje. Posledica toga je da je ograničavajući faktor da li se supstanca sprašuje lako, teško ili se ne može sprašiti.

Za neke supstance više odgovara određivanje temperature mržnjenja ili temperature očvršćavanja, a standardi za ova određivanja dati su u ovoj metodi.

Kada se zbog određenih svojstava supstance ne može izmeriti nijedan od navedenih parametara, odgovarajućom se smatra temperatura tečenja.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Temperatura topljenja jeste temperatura na kojoj se odvija fazni prelaz iz čvrstog u tečno stanje na atmosferskom pritisku, a ta temperatura idealno odgovara temperaturi mržnjenja.

Fazni prelaz mnogih supstanci dešava se u temperaturnom opsegu, pa se on često opisuje kao opseg topljenja.

Prevođenje jedinica (K u °C):

t = T - 273,15

pri čemu:

t jeste temperatura u stepenima Celzijusa (°C);

T jeste termodinamička temperatura u stepenima kelvina (K).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

Neke supstance koje se koriste za kalibraciju date su u literaturi**4**.

*1.4. PRINCIP METODE*

Određuje se temperatura (temperaturni opseg) faznog prelaza iz čvrstog u tečno stanje ili iz tečnog u čvrsto stanje. U praksi se određuju temperature početne i finalne faze topljenja/mržnjenja, zagrevanjem/hlađenjem uzorka supstance koja se ispituje na atmosferskom pritisku. Dato je pet tipova metoda: metoda određivanja temperature topljenja u kapilari, metoda grejne ploče sa postepenim zagrevanjem, metoda određivanja temperature mržnjenja, metoda termalne analize i metoda određivanja temperature tečenja (razvijena za naftna ulja).

U određenim slučajevima, umesto merenja temperature topljenja, pogodno je merenje temperature mržnjenja.

**1.4.1. Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari**

*1.4.1.1. Uređaji za određivanje temperature topljenja u kupatilu sa tečnošću*

Mala količina fino sprašene supstance stavlja se u kapilaru i sabije se. Kapilara se zagreva, zajedno sa termometrom, a porast temperature se podešava na manje od oko 1 K/min za vreme topljenja. Određuju se početna i završna temperatura topljenja.

*1.4.1.2. Temperatura topljenja u uređajima sa metalnim blokom*

Postupak je isti kao postupak opisan u odeljku 1.4.1.1. ove metode, osim što se kapilarna cev i termometar stavljaju u metalni blok koji se zagreva i mogu da se posmatraju kroz otvore u bloku.

*1.4.1.3. Fotoćelijska detekcija*

Uzorak se nalazi u kapilari i zagreva se automatski u metalnom cilindru. Zrak svetlosti se usmerava kroz supstancu kroz otvor na cilindru, na precizno kalibrisanu fotoćeliju. Optička svojstva većine supstanci se prilikom topljenja menjaju od neprovidnosti do providnosti. Intenzitet svetlosti koja dolazi do fotoćelije raste i šalje signal za zaustavljanje na digitalni indikator gde se očitava temperatura sa rezistentnog (otpornog) termometra od platine koji je smešten u komori za zagrevanje. Ova metoda nije pogodna za neke jako obojene supstance.

**1.4.2. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrevanjem**

*1.4.2.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru*

U ovom postupku koriste se dve metalne šipke različite termičke provodljivosti, koje se zagrevaju pomoću električne struje. Poluga je izvedena na način da je temperaturni gradijent uglavnom linearan na celoj njenoj dužini. Temperatura vrele poluge je između 283 K i 573 K sa specijalnim uređajem za očitavanje temperature, koji uključuje i klizač sa pokazivačem i indikatorom napravljenim specijalno za tu polugu. Da bi se odredila temperatura topljenja, supstanca se u tankom sloju nanosi direktno na površinu vrele poluge. U roku od nekoliko sekundi pojavljuje se oštra linija razdvajanja između tečnosti i čvrste faze. Temperatura na liniji razdvajanja očitava se na način da se pokazivač podesi na liniju u mirnom položaju.

*1.4.2.2. Mikroskop za određivanje temperature topljenja*

U upotrebi se nalazi nekoliko tipova mikroskopa sa grejnim pločama sa postepenim zagrevanjem. Koriste se naročito kada se određuju temperature topljenja malih količina supstanci. Kod većine grejnih ploča temperatura se meri osetljivim termoelementom, a ponekad se koriste i termometri sa živom. Tipičan uređaj za određivanje temperature topljenja na grejnoj ploči sa postepenim zagrevanjem sa mikroskopom ima komoru za zagrevanje unutar koje se nalazi metalna ploča na koju se nanosi uzorak na pokrivnoj (kliznoj) staklenoj pločici. U centru metalne ploče nalazi se otvor kroz koji prolazi svetlost sa osvetljenog ogledala mikroskopa. Kada se koristi, komora je zatvorena staklenom pločom koja sprečava prodor vazduha do uzorka.

Zagrevanje uzorka se reguliše reostatom. Za veoma precizna merenja optički anizotropnih supstanci koristi se polarizovano svetlo.

*1.4.2.3. Menisk metoda*

Ova metoda se naročito koristi za poliamide.

Temperatura na kojoj se istiskuje menisk silikonskog ulja, koje je zatvoreno između grejne ploče i staklenog poklopca i uz pomoć uzorka poliamida koji se ispituje, određuje se vizuelno.

**1.4.3. Metoda određivanja temperature mržnjenja**

Uzorak se stavlja u posebnu cev (epruvetu) za ispitivanje i smešta se u aparat za određivanje temperature mržnjenja. Uzorak se polako i neprestano meša za vreme hlađenja, a temperatura se meri u odgovarajućim intervalima. Kada temperatura postane konstantna u nekoliko očitavanja, ta temperatura (korigovana za vrednost greške termometra) beleži se kao temperatura mržnjenja.

Prehlađivanje se izbegava održavanjem ravnoteže između čvrste i tečne faze.

**1.4.4. Metoda termalne analize**

*1.4.4.1 Diferencijalna termalna analiza (DTA)*

Ovom metodom beleže se razlike u temperaturama supstance i referentnog materijala, u funkciji od temperature, kada se supstanca i referentni materijal podvrgavaju istom kontrolisanom temperaturnom programu. Kada uzorak prolazi fazni prelaz, dolazi do promene entalpije, a ta promena se očitava putem endotermnog (za topljenje) ili egzotermnog (za mržnjenje) odstupanja zabeležene temperature od bazne linije.

*1.4.4.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)*

Ovom metodom beleži se razlika u unetoj energiji (toploti) supstance i referentnog materijala, u funkciji od temperature, kada se supstanca i referentni materijal podvrgavaju istom kontrolisanom temperaturnom programu. Ova energija jeste energija neophodna za uspostavljanje nulte temperaturne razlike između supstance i referentnog materijala. Kada uzorak prolazi fazni prelaz, dolazi do promene entalpije, a ta promena se očitava putem endotermnog (za topljenje) ili egzotermnog (za mržnjenje) odstupanja zabeleženog protoka toplote od bazne linije.

**1.4.5. Metoda određivanja temperature tečenja**

Ova metoda je razvijena za naftna ulja i pogodna je za korišćenje kod uljastih supstanci koje imaju niske temperature topljenja.

Posle pripremnog zagrevanja, uzorak se hladi po specifičnom režimu i u intervalima od 3 K ispituju se karakteristike protoka. Najniža temperatura pri kojoj se uočava kretanje supstance beleži se kao temperatura tečenja.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Primenljivost i preciznost različitih metoda koje se koriste za određivanje temperature topljenja/opsega topljenja navedene su u tabelama.

Tabela 1: Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Supstance koje se mogu fino prašiti | Supstance koje nisu  fino sprašene | Temperaturni opseg | Procenjena preciznost**(1)** |
| Uređaji sa kupatilom sa tečnošću**I** | da | mali broj | 273 K do 573 K | ± 0,3 K |
| Uređaji sa metalnim blokom**II** | da | mali broj | 293 K do > 573 K | ± 0,5 K |
| Fotoćelijska detekcija | da | veći broj uz uređaj za primenu | 253 K do 573 K | ± 0,5 K |

**(1)** Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance.

Tabela 2. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrevanjem i metoda određivanja temperature mržnjenja

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Supstance koje se mogu fino sprašiti | Supstance koje nisu fino sprašene | Temperaturni opseg | Procenjena preciznost**(1)** |
| Koflerova**III** metoda | da | ne | 283 K do > 573 K | ± 1 K |
| Mikroskopske**IV** metode | da | mali broj | 293 K do > 573 K | ± 0,5 K |
| Menisk metoda**V** | ne | specifična za poliamide | 293 K do > 573 K | ± 0,5 K |
| Temperatura mržnjenja**VI** | da | da | 223 K do 573 K | ± 0,5 K |

**(1)** Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance.

Tabela 3: Metoda termalne analize

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Supstance koje se mogu fino sprašiti | Supstance koje nisu fino sprašene | Temperaturni opseg | Procenjena preciznost**(1)** |
| Diferencijalna termalna analiza**VII** | da | da | 173 K do 1273 K | do 600 K ± 0,5 K od 600 K do 1273 K ± 2,0 K |
| Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**VII** | da | da | 173 K do 1273 K | do 600 K ± 0,5 K od 600 K do 1273 K ± 2,0 K |

**(1)** Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance.

Tabela 4: Metoda određivanja temperature tečenja

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Supstance koje se mogu fino sprašiti | Supstance koje nisu fino  sprašene | Temperaturni opseg | Procenjena preciznost**(1)** |
| Temperatura tečenja**8** | za naftne proizvode i uljaste supstance | za naftne proizvode i uljaste supstance | 223 K do 323 K | ± 0,3 K |

**(1)** Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**I** JIS K 0064  
**II** ISO 1218 (E)  
**III** ANSI/ASTM D 3451-76  
**IV** DIN 5 3736  
**V** ISO 1218 (E)  
**VI** BS 4695  
**VII** ASTM E 537-76  
**VIII** ASTM D 97-66

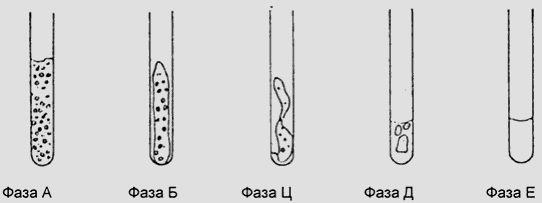
*1.6. OPIS METODE*

Postupci skoro svih metoda ispitivanja opisani su u međunarodnim i nacionalnim standardima (videti Deo drugi ove metode).

**1.6.1. Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari**

Sprašene supstance kada se izlože sporijem rastu temperature obično prolaze kroz faze topljenja prikazane na Slici 1.

Slika 1.



Pri čemu:

Faza A (početak topljenja) jeste faza u kojoj sitne kapljice jednolično prianjaju na unutrašnji zid kapilarne cevi;

Faza B jeste faza u kojoj se javlja prostor između uzorka i unutrašnjeg zida usled sakupljanja istopljene materije;

Faza C jeste faza u kojoj sakupljeni uzorak počinje da pada naniže i da prelazi u tečno stanje;

Faza D jeste faza u kojoj se na površini formira menisk, iako izvesna količina uzorka i dalje ostaje u čvrstom stanju;

Faza E jeste završna faza topljenja u kojoj nema čvrstih čestica.

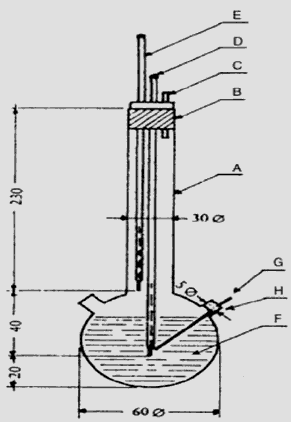
Tokom određivanja temperature topljenja, temperature se beleže na početku topljenja (faza A) i u završnoj fazi (faza E).

*1.6.1.1. Uređaji za određivanje temperature topljenja u kupatilu sa tečnošću*

Na Slici 2. prikazan je standardni aparat od stakla za određivanje temperature topljenja**IX**. Sve dimenzije date su u milimetrima.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**IX** JIS K 0064

Slika 2.



Pri čemu:

A jeste sud za merenje;

B jeste zapušač;

C jeste oduška;

D jeste termometar**X**;

E jeste pomoćni termometar;

F jeste kupatilo sa tečnošću;

G jeste staklena kapilara dužine 80 mm do 100 mm, unutrašnjeg prečnika 1,0 mm ± 0,2 mm, debljine zida 0,2 mm do 0,3 mm;

H jeste bočna cev.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**X** Mogu se koristiti samo termometri koji ispunjavaju uslove standarda: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001 ili uslove ekvivalentnih standarda.

Kupatilo sa tečnošću

Potrebno je izabrati odgovarajuću tečnost. Izbor tečnosti zavisi od temperature topljenja koja se određuje, npr. tečni parafin za temperature topljenja ispod 473 K, silikonsko ulje za temperature topljenja ispod 573 K.

Za temperature topljenja iznad 523 K koristi se smeša koja se sastoji od tri dela sumporne kiseline i dva dela kalijum-sulfata (maseni odnosi). Pri korišćenju ovakve smeše potrebno je preduzeti sve mere predostrožnosti.

Postupak

Suva supstanca se fino spraši u posudi i ubacuje se u kapilaru, zatvorenu na jednom kraju, tako da nivo punjenja bude oko 3 mm nakon što se čvrsto napakuje. Da se dobije homogeno spakovani uzorak, kapilarna cev se ispušta vertikalno kroz staklenu cev, sa visine od oko 700 mm, na sahatno staklo.

Napunjena kapilara se stavlja u kupatilo tako da srednji deo rezervoara sa živom termometra dodiruje kapilaru u delu u kom je smešten uzorak. Obično se kapilara stavlja u aparat na oko 10 K ispod temperature topljenja.

Kupatilo sa tečnošću se zagreva tako da temperatura raste približno 3 K/min. Tečnost se meša. Na oko 10 K ispod očekivane temperature topljenja brzina rasta temperature se podešava na maksimalno 1 K/min.

Izračunavanje

Izračunavanje temperature topljenja vrši se na sledeći način:

T = TD + 0,00016 (TD - TE) n

pri čemu:

T jeste korigovana temperatura topljenja u K;

TD jeste temperatura očitana na termometru D u K;

TE jeste temperatura očitana na termometru E u K;

n jeste broj podeoka živinog stuba na termometru D sa Slike 2. čije je stablo uronjeno u kupatilo.

*1.6.1.2 Uređaji za određivanje temperature topljenja sa metalnim blokom*

Aparatura

Aparatura se sastoji od:

- cilindričnog metalnog bloka, čiji je gornji deo šupalj i formira komoru (videti Sliku 3);

- metalnog poklopca, sa dva ili više otvora kroz koje se mogu ubaciti cevi u metalni blok;

- grejnog sistema metalnog bloka snabdevenim npr. električnim otpornikom smeštenim u bloku;

- reostata (otpornika) za regulaciju struje, ukoliko se koristi grejanje na struju;

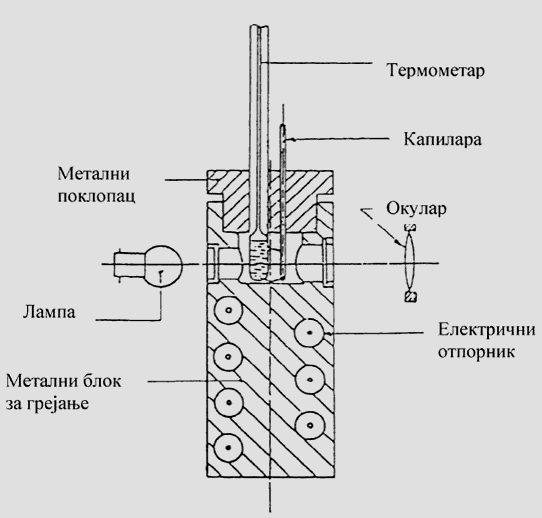
- četiri prozora od stakla otpornog na toplotu na bočnim zidovima komore, koji su međusobno postavljeni pod pravim uglom. Ispred jednog od prozora postavljen je okular za posmatranje kapilarne cevi. Ostala tri prozora su postavljena radi osvetljavanja unutrašnjosti pomoću lampi;

- kapilarne cevi od stakla otpornog na toplotu, zatvorene na jednom kraju (videti odeljak 1.6.1.1. ove metode).

Termometar

Videti standarde navedene u odeljku 1.6.1.1. ove metode. Mogu se primeniti i termo-električni merni uređaji sa uporedivom (sličnom) tačnošću.

Slika 3.



*1.6.1.3. Fotoćelijska detekcija*

Aparatura i procedura

Aparatura se sastoji od metalne komore sa automatskim sistemom grejanja. Tri kapilare se pripremaju u skladu sa odeljkom 1.6.1.1. ove metode i stavljaju se u peć.

Za kalibraciju aparata na raspolaganju je nekoliko linearnih povećanja temperature (temperaturnih programa). Odgovarajući porast temperature se električno podešava na osnovu prethodno izabrane konstantne i linearne brzine. Pokazivači beleže i pokazuju trenutnu temperaturu u peći i temperaturu supstance u kapilarima.

**1.6.2. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrevanjem**

*1.6.2.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru*

Videti Deo drugi ove metode.

*1.6.2.2. Mikroskop za određivanje temperature topljenja*

Videti Deo drugi ove metode.

*1.6.2.3. Menisk metoda (za poliamide)*

Videti Deo drugi ove metode.

Brzina zagrevanja oko temperature topljenja treba da je manja od 1 K/min.

**1.6.3. Metoda određivanja temperature mržnjenja**

Videti Deo drugi ove metode.

**1.6.4. Metoda termalne analize**

*1.6.4.1. Diferencijalna termalna analiza*

Videti Deo drugi ove metode.

*1.6.4.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija*

Videti Deo drugi ove metode.

**1.6.5. Metoda određivanja temperature tečenja**

Videti Deo drugi ove metode.

**2. PODACI**

U nekim slučajevima neophodno je izvršiti korekciju termometra.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i koracima prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo;

- proceni preciznosti.

Srednja vrednost najmanje dva merenja koja su u opsegu procenjene preciznosti (videti tabele) navodi se kao temperatura topljenja.

Ukoliko je razlika između temperature na početku i na kraju završne faze topljenja u granicama preciznosti metode, temperatura u završnoj fazi topljenja se uzima kao temperatura topljenja. Ukoliko navedena razlika nije u granicama preciznosti metode, u izveštaju se navode dve temperature.

Ukoliko se supstanca razloži ili sublimuje pre postizanja temperature topljenja, navodi se temperatura na kojoj je uočen efekat.

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

**4. LITERATURA**

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

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II

3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed.,Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Deo I, Odeljak VII p. 803-834

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

**Deo drugi**

**DODATNI TEHNIČKI PODACI**

Dodatni tehnički podaci mogu se pronaći u sledećim standardima:

**1. Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari**

*1.1. Uređaji za određivanje temperature topljenja u kupatilu sa tečnošću*

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

*1.2. Uređaji sa metalnim blokom*

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

**2. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrevanjem**

*2.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru*

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

*2.2. Mikroskop za određivanje temperature topljenja*

|  |  |
| --- | --- |
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |

*2.3. Menisk metoda (poliamidi)*

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

**3. Metoda određivanja temperature mržnjenja**

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

**4. Metoda termalne analize**

*4.1. Diferencijalna termalna analiza*

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

*4.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija*

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

**5. Metoda određivanje temperature tečenja**

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

**A.2. TEMPERATURA KLJUČANJA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**. Osnovni principi metode dati su u literaturi**2, 3**.

*1.1. UVOD*

Opisane metode i uređaji mogu se primenjivati na tečne supstance i supstance sa niskom temperaturom topljenja, ako ne podležu hemijskoj reakciji na temperaturama ispod temperature ključanja (npr. autooksidacija, premeštanja, razlaganje itd). Metode se primenjuju na tečne supstance koje su čiste, kao i na one koje sadrže nečistoće.

Naglasak je na metodama koje koriste fotoćelijsku detekciju i termalnu analizu, jer metode omogućavaju određivanje temperatura topljenja, kao i temperatura ključanja. Merenja mogu da se vrše automatski.

Dinamička metoda koja je data u ovom prilogu ima tu prednost da primenjuje i za određivanje napona pare i nije neophodno vršiti korekciju temperature ključanja na normalni pritisak (101,325 kPa), jer se normalan pritisak podešava pomoću manostata za vreme merenja.

Napomene: Uticaj nečistoća na određivanje temperature ključanja u velikoj meri zavisi od prirode nečistoće. Kada su u uzorku prisutne isparljive nečistoće koje mogu uticati na rezultat, supstanca se može prečistiti.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Normalna temperatura ključanja jeste temperatura pri kojoj je napon pare tečnosti 101,325 kPa.

Ukoliko se temperatura ključanja ne meri pri normalnom atmosferskom pritisku, zavisnost temperature od pritiska pare opisuje se preko Klauzijus - Klapejronove jednačine:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **log p =** | ***Hv*** | **+ *konst.*** |  |
| **2,3*RT*** |

pri čemu:

*p* jeste pritisak pare supstance u Paskalima;

*DH*v jeste toplota isparenja u J mol-1;

*R* jeste univerzalna gasna konstanta koja iznosi 8,314 J mol-1 K-1;

*T* jeste termodinamička temperatura u stepenima kelvina (K);

Temperatura ključanja se navodi uz uzimanje u obzir ambijentalnog pritiska za vreme merenja.

Prevođenje jedinica:

Pritisak (merna jedinica: kPa): 100 kPa = 1; bar = 0,1 MPa (Dozvoljava se korišćenje merne jedinice "bar", ali se ne preporučuje).

133 Pa = 1 mm; Hg = 1 Torr (Ne dozvoljava se korišćenje merne jedinice "mm Hg" i "Torr").

1 atm = standardna atmosfera = 101 325 Pa (Ne dozvoljava se korišćenje merne jedinice "atm").

Temperatura (merna jedinica: K): t = T - 273,15

pri čemu:

*t* jeste temperatura u stepenima Celzijusa (°C);

T jeste termodinamička temperatura u stepenima kelvina (K).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

Neke supstance koje se koriste za kalibraciju date su u metodama u Delu drugom.

*1.4. PRINCIP METODE*

Dato je sedam tipova metoda za određivanje temperature ključanja (opsega ključanja). Pet metoda zasniva se na merenjima temperatura ključanja, dok se dve metode zasnivaju na termalnoj analizi.

**1.4.1. Merenje temperature ključanja**

*1.4.1.1. Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra*

Ebuliometri su izvorno razvijeni za određivanje molekulske težine na osnovu povećanja tačke ključanja, ali su pogodni i za merenja tačne tačke ključanja**XI**. Tečnost se zagreva u ovom aparatu, pri ravnotežnim uslovima, na atmosferskom pritisku sve do ključanja.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XI** Veoma jednostavan aparat opisan je u standardu ASTM D 1120-72

*1.4.1.2. Dinamička metoda*

Ova metoda obuhvata merenje temperature pri kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare pomoću odgovarajućeg termometra u povratnom toku za vreme ključanja. Kod ove metode može biti varijacija u pritisku.

*1.4.1.3. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja*

Ova metoda obuhvata destilaciju tečnosti i merenje temperature pri kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare i određivanje količine destilata.

*1.4.1.4. Metoda određivanja temperature ključanja po Sivolobofu*

Uzorak se zagreva u cevi (epruveti) za uzorak, koja je uronjena u tečnost kupatila za grejanje. Zatopljena kapilara, koja ima vazdušni mehur u donjem delu, spušta se u cev (epruveti) za uzorke.

*1.4.1.5. Fotoćelijska detekcija*

Radi na principu metode određivanja temperature ključanja po Sivolobofu, uz automatsko foto-električno merenje rastućih mehura.

**1.4.2. Termalna analiza**

*1.4.2.1. Diferencijalna termalna analiza*

Ovom tehnikom beleži se temperaturna razlika između supstance i referentnog materijala kao funkcije temperature, dok se supstanca i referentni materijal izlažu istom kontrolisanom temperaturnom programu. Kada uzorak prolazi fazni prelaz, dolazi do promene entalpije, a ta promena se očitava putem endotermnog odstupanja (ključanje) zabeležene temperature od bazne linije.

*1.4.2.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija*

Ovom tehnikom beleži se razlika u promeni energije (toplote) u supstanci i referentnom materijalu u funkciji od temperature, dok se supstanca i referentni materijal izlažu istom kontrolisanom temperaturnom programu. Ova energija jeste energija neophodna za uspostavljanje nulte temperaturne razlike između supstance i referentnog materijala. Kada uzorak prođe fazni prelaz, praćen promenom entalpije, takva promena se prikazuje endotermnim odstupanjem (ključanje) zabeleženog protoka toplote od bazne linije.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Primenljivost i preciznost različitih metoda koje se koriste za određivanje temperature ključanja/opsega ključanja navedeni su u Tabeli 1.

Tabela 1: Poređenje metoda

|  |  |
| --- | --- |
| Metoda merenja | Procenjena tačnost |
| Ebuliometar**XII** | ± 1,4 K (do 373 K)**(1)(2)** ± 2,5 K (do 600 K)**(1)(2)** |
| Dinamička metoda | ± 0,5 K (do 600 K)**(2)** |
| Destilacija**XIII** | ± 0,5 K (do 600 K) |
| Metoda po Sivolobofu | ± 2 K (do 600 K)**(2)** |
| Fotoćelijska detekcija | ± 0,3 K (do 373 K)**(2)** |
| Diferencijalna termalna analiza**XIV** | ± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1273 K) |
| Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**XV** | ± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1273 K) |

**(1)** Ova preciznost je validna samo za jednostavne uređaje kao što su uređaji opisani npr. u standardu ASTM D 1120-72. Preciznost se poboljšava primenom modernijih ebuliometara.

**(2)** Ova preciznost je validna samo za čiste supstance. Upotreba u drugim slučajevima se opravdava. Određuje se procenjena tačnost.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XII** ASTM D 1120-72  
**XIII** ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71  
**XIV** ASTM E 537-76  
**XV** ASTM E 537-76

1.6. OPIS METODE

Postupci nekih metoda ispitivanja opisani su u međunarodnim i nacionalnim standardima (videti Deo drugi ove metode).

**1.6.1. Merenje temperature ključanja**

*1.6.1.1. Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra*

Videti Deo drugi ove metode.

*1.6.1.2. Dinamička metoda*

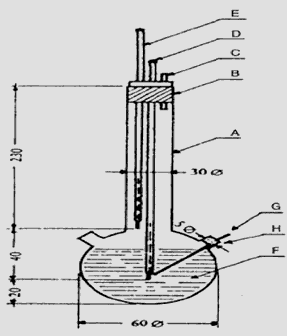
Videti metodu ispitivanja A.4. za određivanje napona pare koja je data u ovom prilogu.

Beleži se temperatura ključanja uočena na primenjenom pritisku od 101,325 kPa.

*1.6.1.3. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja (opsega ključanja)*

Videti Deo drugi ove metode.

Slika 1.



Pri čemu:

A jeste sud za merenje;

B jeste zapušač;

C jeste oduška;

D jeste termometar;

E jeste pomoćni termometar;

F jeste kupatilo sa tečnošću;

G jeste staklena kapilara za uzorak spoljnjeg prečnika maksimalno 5 mm, dužine približno 100 mm, unutrašnjeg prečnika 1 mm i debljine zida 0,2 mm do 0,3 mm;

H jeste bočna cev.

*1.6.1.4. Metoda određivanja temperature ključanja po Sivolobofu*

Uzorak se zagreva u aparatu za određivanje tačke topljenja u staklenoj kapilari za uzorke, prečnika oko 5 mm (videti Sliku 1).

Slika 1. prikazuje tip standardizovanih aparata za određivanje temperatura topljenja i ključanja**XVI**. Aparati su napravljeni od stakla. Sve dimenzije na Slici 1. date su u milimetrima.

Kapilara (za kapilarno ključanje) zatopljena na oko 1 cm iznad donjeg dela stavlja se u kapilaru za uzorak. Nivo do kojeg se dodaje supstanca koja se ispituje je takav da je zatopljeni deo unutrašnje kapilare ispod površine tečnosti. Kapilara za uzorke koja sadrži kapilaru za ključanje pričvršćuje se za termometar gumenim kaišem ili se fiksira držačima sa strane (videti Sliku 2).

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 2 | Slika 3 |
| Postupak prema Sivolobofu | Modifikovani postupak |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s005.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s006.gif |

Tečnost za kupatilo bira se u skladu sa temperaturom ključanja. Za temperature do 573 K koristi se silikonsko ulje. Tečni parafin se koristi samo do 473 K. Grejanje kupatila sa tečnošću se podešava na početku na porast temperature od 3 K/min. Tečnost u kupatilu se meša. Na oko 10 K ispod očekivane temperature ključanja grejanje se smanjuje, tako da porast temperature bude manji od 1 K/min. Po postizanju temperature ključanja, iz kapilare za ključanje brzo se pojavljuju mehurići.

Temperatura ključanja je ona temperatura pri kojoj uz momentalno hlađenje niz mehurića se prekida i tečnost počne da se penje u kapilaru. Odgovarajuća očitana temperatura na termometru predstavlja tačku ključanja supstance.

Kod modifikovanog principa (videti Sliku 3) temperatura ključanja se određuje u kapilari za određivanje temperature topljenja. Kapilara se sužava do završne tačke u dužini od oko 2 cm (a) i unosi se mala količina uzorka. Otvoreni kraj kapilare je zatopljen tako da na dnu zaostaje mali mehur vazduha. Zagrevanjem uzorka mehur vazduha se širi (b). Temperatura ključanja je ona temperatura na kojoj supstanca dostigne nivo tečnosti u kupatilu (c).

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVI** JIS K 0064

*1.6.1.5. Fotoćelijska detekcija*

Uzorak se zagreva u kapilarnoj cevi unutar zagrejanog metalnog bloka.

Snop svetlosti se usmerava kroz supstancu, kroz odgovarajuće otvore u bloku, na precizno kalibrisanu fotoćeliju.

U toku porasta temperature uzorka pojavljuju se pojedinačni mehurići iz kapilare za ključanje. Kada se postigne temperatura ključanja, broj mehurića naglo raste. Ovo uzrokuje promenu u intenzitetu svetlosti, što beleži fotoćelija i indikatoru daje signal za zaustavljanje, uz očitavanje temperature na platinskom otpornom termometru koji se nalazi u bloku.

Ova metoda je korisna jer omogućava određivanja temperature ključanja ispod sobne temperature i do 253,15 K (-20° C) bez promena u aparatu. Samo je potrebno instrument smestiti u kupatilo za hlađenje.

**1.6.2. Termalna analiza**

*1.6.2.1. Diferencijalna termalna analiza*

Videti Deo drugi ove metode.

*1.6.2.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija*

Videti Deo drugi ove metode.

**2. PODACI**

Pri malim odstupanjima od normalnog pritiska (maksimalno ± 5 kPa), temperature ključanja se normalizuju do Tn pomoću sledeće Sidni Jangove jednačine sa vrednošću brojeva:

Tn = T + (fT x Δp)

pri čemu:

Δp jeste razlika: 101,325 - *p* (obratiti pažnju na znak +/-);

*p* jeste izmereni pritisak u kPa;

fT jeste brzina promene temperature ključanja sa pritiskom u K/kPa;

T jeste izmerena temperatura ključanja u stepenima kelvina (K);

Tn jeste temperatura ključanja korigovana na normalan pritisak u stepenima kelvina (K).

Faktori korekcije temperature (fT) i jednačine za njihovu aproksimaciju uključeni su u međunarodne i nacionalne standarde za mnoge supstance.

Tabela 2: Faktori korekcije temperature ft**XVII**

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura T (K) | Faktor korekcije fT (K/kPa) |
| 323,15 | 0,26 |
| 348,15 | 0,28 |
| 373,15 | 0,31 |
| 398,15 | 0,33 |
| 423,15 | 0,35 |
| 448,15 | 0,37 |
| 473,15 | 0,39 |
| 498,15 | 0,41 |
| 523,15 | 0,43 |
| 548,15 | 0,45 |
| 573,15 | 0,47 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVII** U metodi DIN 53171 date su grube korekcije za rastvarače koji se koriste u industriji boja i lakova.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i koracima prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo;

- proceni preciznosti.

Srednja vrednost najmanje dva merenja koja su u opsegu procenjene tačnosti (videti Tabelu 1) navodi se kao temperatura ključanja.

Navode se izmerene temperature ključanja i njihove srednje vrednosti, a pritisak, odnosno pritisci pri kojima su izvršena merenja navode se u kPa. Poželjno je da pritisak bude blizu normalnog atmosferskog pritiska.

U izveštaju se navode svi podaci i napomene relevantne za tumačenje rezultata, naročito one koje se odnose na nečistoće i fizičko stanje supstance.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

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

**Deo drugi**

**DODATNI TEHNIČKI PODACI**

Dodatni tehnički podaci mogu se pronaći u sledećim standardima:

**1. Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra**

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

**2. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja (opsega ključanja)**

|  |  |
| --- | --- |
| ISO/R 918 | Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range) |
| BS 4349/68 | Method for determination of distillation of petroleum products |
| BS 4591/71 | Method for the determination of distillation characteristics |
| DIN 53171 | Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes |
| NF T 20-608 | Distillation: détermination du rendement et de l‘intervalle de distillation |

**3. Diferencijalna termalna analiza i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija**

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

**A.3. RELATIVNA GUSTINA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**. Osnovni principi metode dati su u literaturi**2**.

*1.1. UVOD*

Opisane metode za određivanje relativne gustine mogu se primenjivati na čvrste i tečne supstance, bez ograničenja u pogledu njihovog stepena čistoće. Različite metode koje se koriste date su u Tabeli 1.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Relativna gustina D204 za čvrste ili tečne supstance jeste odnos između mase, zapremine supstance koja se ispituje (određene na 20° C) i mase iste zapremine vode (određene na 4° C). Relativna gustina nema dimenziju.

Gustina (*r*) supstance jeste količnik mase (*m*) i zapremine (*v*) supstance.

Gustina (*r*) supstance se u Međunarodnom sistemu jedinica (SI) izražava u kg/m3.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE****1, 3***

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

*1.4. PRINCIP METODE*

Koriste se četiri tipa metoda.

**1.4.1. Metoda potiska**

*1.4.1.1. Areometar (za tečne supstance)*

Dovoljno tačno i brzo određivanje gustine dobija se pomoću plutajućih areometara, kod kojih se gustina tečnosti utvrđuje na osnovu dubine potapanja koja se očitava na graduisanoj skali.

*1.4.1.2. Hidrostatička vaga (za tečne i čvrste supstance)*

Razlika između težine ispitivanog uzorka merenog u vazduhu i merenog u odgovarajućoj tečnosti (npr. u vodi) koristi se za određivanje gustine ispitivanog uzorka.

Za određivanje gustine čvrste supstance izmerena gustina jeste reprezentativna gustina samo za ispitivani uzorak. Za određivanje gustine tečnosti prvo se meri masa tela poznate zapremine (V) u vazduhu, a zatim u tečnosti.

*1.4.1.3. Metoda uranjanja tela (za tečne supstance)****4***

Po ovoj metodi gustina tečnosti određuje se iz razlike rezultata merenja mase tečnosti pre i posle zaranjanja tela poznate zapremine u tečnost koja se ispituje.

**1.4.2. Metoda piknometra**

Za čvrste ili tečne supstance mogu se koristiti piknometri različitih oblika sa poznatim zapreminama. Gustina se određuje iz razlike u masi između punog i praznog piknometra i njegove poznate zapremine.

**1.4.3. Vazdušni uporedni piknometar (za čvrste supstance)**

Gustina čvrste supstance u bilo kom obliku meri se na sobnoj temperaturi sa gasnim uporednim piknometrom. Zapremina supstance meri se u vazduhu ili u inertnom gasu u cilindru promenljive kalibrisane zapremine. Za proračun gustine uzima se jedno merenje mase, nakon merenja zapremine.

**1.4.4. Oscilujući merač gustine5, 6, 7**

Gustina tečnosti meri se pomoću oscilujućeg merača gustine. Mehanički oscilator, napravljen u obliku cevi latiničnog slova U (U), vibrira na frekvenciji rezonance oscilatora koja zavisi od njegove mase. Unošenje uzorka menja frekvenciju rezonance oscilatora. Aparat se kalibriše pomoću dve tečne supstance poznate gustine. Ove supstance se biraju na način da njihove gustine obuhvataju opseg koji se meri.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Primenljivost različitih metoda koje se koriste za određivanje relativne gustine data je u Tabeli.

*1.6. OPIS METODE*

U Delu drugom ove metode dati su standardi kao primer koji se konsultuju za dodatne tehničke podatke.

Izvode se najmanje dva merenja na temperaturi od 20° C.

**2. PODACI**

Videti standarde date u Delu drugom ove metode.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i koracima prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo.

Relativna gustina (D204) se u izveštaju navodi u skladu sa definicijom datom u odeljku 1.2. ove metode, zajedno sa fizičkim stanjem merene supstance.

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

Tabela: Primenljivost metoda

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Gustina | | Maksimalan mogući dinamički viskozitet |
| čvrsto | tečno |
| Areometar**XVIII** |  | da | 5 Pa s |
| Hidrostatička vaga**XIX** a) hemikalije u čvrstom stanju b) tečnosti |  |  |  |
| da | da |  |
| 5 Pa s |
| Metoda uranjanja tela**XX** |  | da | 20 Pa s |
| Metoda piknometra**XXI** a) hemikalije u čvrstom stanju b) tečnosti | da | da | 500 Pa s |
| Vazdušni uporedni piknometar**XXII** | da |  |  |
| Oscilujući merač gustine |  | da | 5 Pa s |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVIII** ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050  
**XIX** ISO 1183 (A), ISO 901 i 758  
**XX** DIN 53217  
**XXI** ISO 3507, ISO 1183 (B), NF T 20-053, ISO 758  
**XXII** DIN 55990, DIN 53243

**4. LITERATURA**

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

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

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

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

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

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

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

**Deo drugi**

**DODATNI TEHNIČKI PODACI**

Dodatni tehnički podaci mogu se pronaći u sledećim standardima:

**1. Metoda potiska**

*1.1. Areometar*

|  |  |
| --- | --- |
| DIN 12790, ISO 387 | Hydrometer; general instructions |
| DIN 12791 | Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use |
|  | Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation |
|  | Part III: Use and test |

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

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

DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

*1.2. Hidrostatička vaga*

1.2.1. Za čvrste supstance

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

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

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

DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

1.2.2 Za tečne supstance

ISO 901 ISO 758

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

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

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

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

*1.3. Metoda uranjanja tela*

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

**2. Metoda piknometra**

*2.1. Za tečne supstance*

ISO 3507 Pycnometers

ISO 758 Liquid chemical products; determination of density at 20 °C

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

DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100 10-6 m2s-1 at 15 °C)

DIN 12800 Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)

DIN 12801 Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10-6 m2 s-1 at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

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

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

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

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

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

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

ASTM D 297 Section 15: Rubber products - chemical analysis

ASTM D 2111 Method C: Halogenated organic compounds

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

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

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

*2.2. Za čvrste supstance*

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

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

DIN 19683 Determination of the density of soils

**3. Vazdušni uporedni piknometar**

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

DIN 53243 Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

**A.4. NAPON PARE**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 104 (2004).

*1.1. UVOD*

Metoda A.4.**1**, u odnosu na raniju verziju, sadrži dodatnu metodu, Metodu efuzije: izotermalne termogravimetrije, koja je namenjena za supstance sa vrlo niskim naponom pare (do 10-10 Pa). Usled potreba za postupcima, posebno kad se radi o određivanju napona pare za supstance sa niskim naponom pare, ponovo se ocenjuju i drugi postupci u okviru ove metode u odnosu na druge opsege primene.

U termodinamičkoj ravnoteži napon pare čiste supstance zavisi isključivo od temperature. Osnovni principi dati su u literaturi**2, 3**.

Ne postoji jedinstveni postupak merenja koji se primenjuje na celokupni opseg napona pare, koji se kreće od ispod 10-10 Pa do 105 Pa. Ova metoda obuhvata osam metoda za merenje napona pare, koje se mogu primeniti u različitim rasponima napona pare. U Tabeli 1. koja je data u ovoj metodi dato je poređenje različitih metoda u odnosu na njihovu primenu i merni opseg. Ove metode mogu se primeniti samo na jedinjenja koja se ne razgrađuju u uslovima ispitivanja. Ako se napon pare iz tehničkih razloga ne može odrediti nekom od eksperimentalnih metoda, on se procenjuje, a preporučena metoda procene navedena je u Dodatku koji je dat u Delu drugom ove metode.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Napon pare supstance jeste pritisak zasićene pare iznad čvrste ili tečne supstance.

U Međunarodnom sistemu jedinica SI jedinica za pritisak koja se koristi za ove potrebe jeste paskal (Pa).

Merne jedinice koje su se ranije koristile, zajedno sa faktorima njihove konverzije, su:

|  |  |
| --- | --- |
| 1 Torr = 1 mm Hg | = 1,333 × 102 Pa |
| 1 atmosfera | = 1,013 × 105 Pa |
| 1 bar | = 105 Pa |

SI jedinica za temperaturu jeste kelvin (K). Za konverziju Celzijusovih stepeni u kelvine koristi se formula:

T = *t* + 273,15

pri čemu:

T jeste temperatura u kelvinima ili termodinamička temperatura;

*t* jeste temperatura u Celzijusovim stepenima.

Tabela 1.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda merenja | Supstance | | Procenjena ponovljivost | Procenjena reproduktivnost | Preporučeni opseg |
| Čvrsta supstanca | Tečnost |
| Dinamička metoda | niska tačka topljenja | Da | do 25%  1% do 5% | do 25%  1% do 5% | 103 Pa  do 2 x 103 Pa  2 x 103 Pa  do 105 Pa |
| Statička metoda | Da | Da | 5% do 10% | 5% do 10% | 10 Pa do 105 Pa 10-2 Pa  do 105 Pa [1] |
| Metoda sa izotenzioskopom | Da | Da | 5% do 10% | 5% do 10% | 102 Pa do 105 Pa |
| Metoda efuzije: merenje napona pare | Da | Da | 5% do 20% | do 50% | 10-3 Pa do 1 Pa |
| Metoda efuzije: Knudsenova ćelija | Da | Da | 10% do 30% | - | 10-10 Pa do 1 P |
| Metoda efuzije: izotermalna termogravimetrija | Da | Da | 5% do 30% | do 50% | 10-10 Pa do 1 Pa |
| Metoda zasićenja gasa | Da | Da | 10% do 30% | do 50% | 10-10 Pa do 103 Pa |
| Metoda sa rotirajućom kuglicom | Da | Da | 10% do 20% | - | 10-4 Pa do 0,5 Pa |
| [1] Ako se koristi kapacitivni manometar. | | | | | |

*1.3. PRINCIP MERENJA*

Napon pare se, uglavnom, određuje pri različitim temperaturama. U ograničenom rasponu temperature, logaritam napona pare čiste supstance jeste linearna funkcija recipročne termodinamičke temperature, u skladu sa pojednostavljenom Klapejron - Klauzijusovom jednačinom:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***log p* =** | **Hv** | **+ *konst.*** |  |
| **2,3RT** |

pri čemu:

*p* jeste napon pare u paskalima;

ΔHv jeste toplota isparavanja u J mol-1;

R jeste univerzalna gasna konstanta koja iznosi 8,314 J mol-1 K-1;

T jeste temperatura u K.

*1.4. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nije potrebno koristiti referentne supstance. One prvenstveno služe za povremenu proveru učinka metode i omogućavaju poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Dinamička metoda (Kotrelova metoda)**

*1.5.1.1. Princip metode*

Napon pare određuje se merenjem temperature ključanja supstance pri različitim zadatim pritiscima između oko 103 Pa i 105 Pa. Ova metoda preporučuje se i za određivanje temperature ključanja. U tu svrhu se koristi do temperature od 600 K. Temperatura ključanja tečnosti je za približno 0,1 °C viša na dubini od 3 cm do 4 cm nego na površini zbog hidrostatičkog pritiska tečnosti u koloni. Kod Kotrelove metode**4** termometar se nalazi u pari iznad površine tečnosti, a tečnost koja ključa neprekidno se pumpa preko glave termometra. Glava termometra prekriva se tankim slojem tečnosti koja je u ravnoteži sa parom pri atmosferskom pritisku. Termometar tako pokazuje stvarnu tačku ključanja bez grešaka usled pregrevanja ili hidrostatičkog pritiska. Originalna Kotrel pumpa prikazana je na Slici 1. koja je data u ovoj metodi. Cev A sadrži tečnost koja ključa. Platinasta žica B utisnuta u dno omogućava ravnomerno ključanje. Bočna cevčica C vodi do kondenzatora, dok poklopac D onemogućava da hladni kondenzat dođe do termometra E. Kad tečnost u cevi A ključa, mehurići i tečnost koji dospeju u levak prolaze kroz dva kraka pumpe F i prelivaju se preko glave termometra.

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 1. | Slika 2. |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s007.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s008.gif |
| Kotrelova pumpa (4) |  |

A: Termopar  
B: Vakuumska puferska zapremina  
C: merač pritiska  
D: Vakuum  
E: Merna tačka  
F: Grejni element oko 150 W

*1.5.1.2. Aparatura*

Na Slici 2. koja je data u ovoj metodi prikazana je aparatura koja radi prema Kotrelovom principu. Sastoji se od cevi sa prostorom za ključanje u donjem delu, hladnjakom u srednjem delu i ispustom i prirubnicom u gornjem delu. Kotrelova pumpa smeštena je u prostoru za ključanje, koji se zagreva električnim grejačem. Temperatura se meri termoparom ili otpornim termometrom, koji se umeće kroz prirubnicu na vrhu. Ispust je spojen na sistem regulacije pritiska. Ovaj poslednji sastoji se od vakuumske pumpe, puferske zapremine, manostata za podešavanje dotoka azota za regulaciju pritiska i manometra.

*1.5.1.3. Postupak merenja*

Supstanca se stavlja u prostor za ključanje. Problemi se mogu javiti u slučaju kad čvrste supstance nisu praškaste, ali to je nekad moguće rešiti zagrevanjem obloge hladnjaka. Aparat se pečati kod prirubnice i iz supstance se izvlači vazduh. Ovom metodom ne mogu se meriti supstance koje pene.

Zatim se podešava najniži željeni pritisak i uključuje zagrevanje. Istovremeno se temperaturni senzor priključuje na štampač.

Ravnoteža se postiže kada se pri stalnom pritisku beleži stalna temperatura ključanja. Posebno se vodi računa da se izbegne burno ključanje. Na hladnjaku dolazi do potpune kondenzacije. Kod određivanja pritiska pare čvrstih supstanci s niskom tačkom topljenja vodi se računa da ne dođe do začepljenja kondenzatora.

Kad se zabeleži tačka ravnoteže, podešava se viši pritisak. Postupak se nastavlja na isti način dok se ne dođe do 105 Pa (ukupno oko 5 do 10 mernih tačaka). Radi provere, potrebno je ponavljati tačke ravnoteže pri opadajućem pritisku.

**1.5.2. Statička metoda**

*1.5.2.1. Princip metode*

Kod statičke metode**5** napon pare u termodinamičkoj ravnoteži određuje se pri zadatoj temperaturi. Ova metoda pogodna je za supstance i za višekomponentne tečnosti i čvrste materijale u rasponu od 10-1 Pa do 105 Pa, a uz poseban oprez, i u rasponu od 1 Pa do 10 Pa.

*1.5.2.2. Aparatura*

Uređaj se sastoji od kupatila sa stalnom temperaturom (preciznost ± 0,2 K), posude za uzorak spojene sa vakuumskom cevi, manometra i sistema za regulaciju pritiska. Komora sa uzorkom (Slika 3a koja je data u ovoj metodi) povezana je sa vakuumskom cevi preko ventila i diferencijalnog manometra (*U*-cev koja sadrži odgovarajuću manometarsku tečnost) koji služi kao nulti pokazatelj. U manometru se mogu koristiti živa, silikoni i ftalati, zavisno od raspona pritiska i hemijskih svojstava ispitivane supstance. Upotreba žive se izbegava kad god je to moguće imajući u vidu njenu štetnost po životnu sredinu. Ispitivana supstanca se ne sme primetno rastvarati u tečnosti *U*-cevi niti sa njom reagovati. Umesto *U*-cevi koristi se manometar (Slika 3b koja je data u ovoj metodi). Živa se u manometru koristi u rasponu od normalnog pritiska do 102 Pa, dok su silikonske tečnosti i ftalati pogodni za pritiske ispod 102 Pa do 10 Pa. Postoje i drugi merači pritiska koji se mogu koristiti ispod 102 Pa, a manometri sa membranom pogodni za zagrevanje mogu se koristiti čak i ispod 10-1 Pa. Temperatura se meri na spoljnom zidu posude sa uzorkom ili u samoj posudi.

*1.5.2.3. Postupak merenja*

Koristeći aparat prikazan na Slici 3a, *U*-cev se napuni odabranom tečnošću iz koje je pre očitavanja potrebno odstraniti gasove na povišenoj temperaturi. Ispitivana supstanca stavi se u aparaturu i iz nje se izvuče vazduh na sniženoj temperaturi. U slučaju višekomponentnih uzoraka temperatura treba da bude dovoljno niska da ne dođe do promene sastava materijala. Uspostavljanje ravnoteže ubrzava se mešanjem. Uzorak se hladi tečnim azotom ili suvim ledom, ali se pazi da ne dođe do kondenzacije vazduha ili tečnosti u pumpi. Otvori se ventil iznad posude s uzorkom i nekoliko minuta vrši vakumiranje kako bi se uklonio vazduh. Postupak izvlačenja vazduha se, prema potrebi, ponavlja više puta.

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 3a | Slika 3b |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s009.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s010.gif |
| 1: Ispitivana supstanca 2: Parna faza 3: Visokovakuumski ventil 4: U-cev (pomoćni manometar) 5: Manometar 6: Termostatsko kupatilo 7: Uređaj za merenje temperature 8: Vod do vakuumske pumpe 9: Ventilacija/azot | 1: Ispitivana supstanca 2: Parna faza 3: Visokovakuumski ventil 4: Manometar 5: Pokazivač pritiska 6: Termostatsko kupatilo 7: Uređaj za merenje temperature |

Kad se uzorak zagreva sa zatvorenim ventilom, napon pare se povećava. Time se menja ravnoteža tečnosti u *U*-cevi. Da bi se povratila ravnoteža, u aparaturu se dovodi azot ili vazduh dok se indikator diferencijalnog pritiska ne vrati na nulu. Pritisak koji je za to potreban očitava se na preciznom manometru. Taj pritisak odgovara naponu pare supstance na temperaturi merenja. Ako se koristi aparatura opisana na Slici 3b, napon pare se direktno očitava.

Napon pare se određuje u odgovarajuće malim temperaturnim intervalima (ukupno oko 5 do 10 mernih tačaka) do željene maksimalne temperature.

Radi provere, ponavljaju se očitavanja na niskim temperaturama. Ako se vrednosti dobijene pri ponovljenim očitavanjima ne podudaraju sa krivom za rastuću temperaturu, mogući razlozi su:

1) u uzorku još ima vazduha (npr. u slučaju jako viskoznih materijala) ili supstanci sa niskom tačkom ključanja koji se oslobađaju prilikom zagrevanja;

2) supstanca hemijski reaguje u temperaturnom opsegu koje se ispituje (npr. razlaganje, polimerizacija).

**1.5.3. Izotenzioskop**

*1.5.3.1. Princip metode*

Izotenzioskop**6** se zasniva na principu statičke metode. Ova metoda podrazumeva stavljanje uzorka u balon koji se održava na stalnoj temperaturi i koji je spojen na manometar i vakuumsku pumpu. Nečistoće koje su isparljivije od ispitivane supstance uklanjaju se vakumiranjem vazduha na smanjenom pritisku. Napon pare uzorka pri odabranim temperaturama izjednačava se s poznatim pritiskom inertnog gasa. Izotenzioskop je prvobitno izrađen za merenje napona pare nekih tečnih ugljovodonika, ali je pogodan i za ispitivanje čvrstih supstanci. Metoda po pravilu nije pogodna za višekomponentne sisteme. Male greške u rezultatima moguće su kod uzoraka koji sadrže neisparljive nečistoće. Preporučeni raspon je od 102 Pa do 105 Pa.

*1.5.3.2. Aparatura*

Primer mernog uređaja prikazan je na Slici 4. koja je data u ovoj metodi. Detaljan opis dat je u literaturi**6**.

*1.5.3.3. Postupak merenja*

Kad se ispituju tečnosti, sama supstanca služi kao tečnost pomoćnog manometra. U izotenzioskop stavi se količina tečnosti koja je potrebna da se napuni balon i kraći krak manometra. Izotenzioskop se spaja na vakuumski sistem kako bi se uklonio vazduh, a zatim se napuni azotom. Uklanjanje i ispiranje sistema ponavlja se dva puta kako bi se uklonio preostali kiseonik. Izotenzioskop se postavlja u vodoravan položaj tako da se uzorak u tankom sloju raširi po balonu i manometru. Pritisak sistema smanji se na 133 Pa i uzorak polako zagreva do ključanja (uklanjanje rastvorenih gasova). Izotenzioskop se zatim položi tako da se uzorak vrati u balon i napuni kraći krak manometra. Pritisak se održava na 133 Pa. Izduženi vrh balona s uzorkom zagreva se na malom plamenu dok se para koja se oslobađa iz uzorka ne raširi dovoljno da potisne deo uzorka iz gornjeg dela balona i kraka manometra u manometar, stvarajući prostor ispunjen parom u kome nema azota. Izotenzioskop se zatim stavlja u kupatilo sa stalnom temperaturom i pritisak azota podešava dok se ne izjednači s pritiskom pare uzorka. U ravnoteži je pritisak azota jednak pritisku pare supstance.

|  |
| --- |
| Slika 4. |
| |  |  | | --- | --- | | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s011.gif | A: Regulacija pritiska B: Cev spoljnog prečnika 8 mm C: Suvi azot u potisnom sistemu D: Para uzorka E: Vršak F: Tečni uzorak | |
| (Dimenzije u mm) |

U slučaju čvrstih supstanci, zavisno od opsega pritiska i temperature, koriste se manometarske tečnosti kao što su silikonske tečnosti ili ftalati. Manometarska tečnost iz koje je izvučen vazduh stavlja se u proširenje na dužem kraku izotenzioskopa. Nakon toga čvrsta supstanca koja se ispituje stavlja se u balon za uzorak i iz nje se izvlači vazduh na povišenoj temperaturi. Izotenzioskop se zatim nagne tako da manometarska tečnost otiče u *U*-cev.

**1.5.4. Metoda efuzije: merenje napona pare7**

*1.5.4.1. Princip metode*

Uzorak ispitivane supstance zagreje se u maloj peći i stavi u zvono pod vakumom. Peć se prekrije poklopcem na kome se nalaze rupice poznatog prečnika. Para supstance koja izlazi kroz jednu od rupica udara o tas vrlo osetljive vage, koja je takođe smeštena u zvonu. Kod nekih konstrukcija tas vage je umetnut u kućište za hlađenje, koje procesom vođenja toplote obezbeđuje rasipanje toplote prema spoljnoj sredini, i hladi se isijavanjem, tako da se izlazeća para na njoj kondenzuje. Moment mlaza pare deluje kao sila na vagu. Napon pare se određuje na dva načina: direktno iz sile koja udara o tas vage ili iz brzine isparavanja pomoću Herc-Knudsenove jednačine**2**:



pri čemu:

G jeste brzina isparavanja (kg s-1 m-2);

M jeste molarna masa (g mol-1);

T jeste temperatura (K);

R jeste univerzalna gasna konstanta (J mol-1 K-1);

P jeste napon pare (Pa).

Preporučeni raspon koji se meri ovom metodom je od 10-3 Pa do 1 Pa.

*1.5.4.2. Aparatura*

Aparatura za primenu opšteg principa merenja prikazana je na Slici 5. koja je data u ovoj metodi:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Slika 5. | | |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s013.gif | | |
|  | A: Postolje B: Instrument sa pokretnim kalemom C: Zvono D: Vaga sa tasom E: Vakuum pumpa | F: Kućište za hlađenje i šipka za hlađenje G: Peć za isparavanje H: Devar posuda sa tečnim azotom I: Merenje temperature uzorka J: Ispitivana supstanca |

**1.5.5. Metoda efuzije: Knudsenova ćelija**

*1.5.5.1. Princip metode*

Ova metoda zasniva se na proceni mase ispitivane supstance koja u obliku pare ističe kroz mikrootvor Knudsenove ćelije**8** u jedinici vremena u uslovima visokog vakuuma. Masa pare se dobija određivanjem gubitka mase ćelije ili kondenzacijom pare na niskoj temperaturi i hromatografskim određivanjem količine supstance koja je prešla u paru. Napon pare izračunava se primenom Herc - Knudsenovog odnosa (videti odeljak 1.5.4.1. ove metode) uz faktore korekcije koji zavise od parametara aparata**9**. Preporučeni opseg je od 10-10 Pa do 1 Pa**10, 11, 12, 13, 14**.

*1.5.5.2. Aparatura*

Aparatura za primenu opšteg principa merenja prikazana je na Slici 6. koja je data u ovoj metodi.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Slika 6. | | |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s014.gif | | |
|  | 1: Priključak na vakuum 2: Otvori platinastog otporničkog termometra ili merenje i kontrola temperature 3: Poklopac rezervoara za vakuum 4: O-presek 5: Aluminijumski rezervoar za vakuum | 6: Uređaj za postavljanje i skidanje efuzijskih ćelija 7: Poklopac sa navojem 8: Leptir matice 9: Vijci 10: Efuzijske ćelije od nerđajućeg čelika 11: Kertridž grejača |

**1.5.6. Metoda efuzije: izotermalna termogravimetrija**

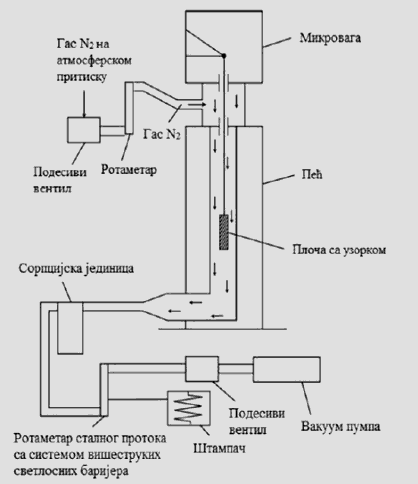
*1.5.6.1. Princip metode*

Ova metoda zasniva se na određivanju brzina isparavanja ispitivane supstance pri povišenim temperaturama i atmosferskom pritisku primenom termogravimetrije**10,15,16,17,18,19,20**. Brzine isparavanja vT dobijaju se izlaganjem odabranog jedinjenja atmosferi spore struje inertnog gasa i praćenjem gubitka mase pri definisanim izotermalnim temperaturama T u stepenima kelvina u odgovarajućim vremenskim periodima. Naponi pare pT izračunavaju se iz vrednosti vT na osnovu linearnog odnosa između logaritma napona pare i logaritma brzine isparavanja. Ako je potrebno, napravi se ekstrapolacija na temperature od 20° C i 25° C regresionom analizom log pT uzavisnosti od 1/T. Ova metoda je pogodna za supstance sa niskim naponom pare čak do 10-10 Pa (10-12 mbar), s tim da čistoća supstanci treba da bude blizu 100% kako bi se izbeglo pogrešno tumačenje izmerenih gubitaka mase.

*1.5.6.2. Aparatura*

Aparatura za primenu opšteg principa merenja prikazana je na Slici 7. koja je data u ovoj metodi.

Slika 7.



Preko nosača uzorka okačenog na mikrovagi u komori sa kontrolisanom temperaturom pušta se struja suvog azota koja sa sobom odnosi molekule pare ispitivane supstance. Gasna struja se po izlasku iz komore pročišćava u sorpcijskoj jedinici.

*1.5.6.3. Postupak merenja*

Ispitivana supstanca ravnomerno se nanese u sloju na površinu hrapave staklene ploče. U slučaju čvrstih supstanci ploča se ravnomerno nakvasi rastvorom supstance u odgovarajućem rastvaraču i osuši u inertnoj atmosferi. Kod merenja, ploča sa slojem ispitivane supstance okači se u termogravimetrijski analizator i nakon toga gubitak mase se neprekidno meri u funkciji vremena.

Brzina isparavanja vT pri određenoj temperaturi izračunava se iz gubitka mase Δm ploče sa uzorkom pomoću formule:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***v*T =** | Δ**M** | ***gcm*-2h-1)** |  |
| **F x t** |

pri čemu:

*F* jeste površina nanesene ispitivane supstance, po pravilu površina ploče s uzorkom;

*t* jeste vreme gubitka mase Δm.

Napon pare pT izračunava se na osnovu funkcije brzine isparavanja vT:

*log pT = C + D x Hlog vT*

pri čemu:

C i D jesu specifične konstante eksperimentalne aparature, koje zavise od prečnika merne komore i brzine protoka gasa.

Konstante C i D određuju se jednom, merenjem niza jedinjenja poznatog napona pare i regresijom log pT u zavisnosti od log vT**11, 21, 22**.

Odnos između napona pare pT i temperature T u stepenima kelvina proizlazi iz formule:

*log pT = A + B x 1/T*

pri čemu:

A i B jesu konstante dobijene regresijom log pT u zavisnosti od 1/T.

Uz pomoć ove jednačine napon pare se izračunava za bilo koju drugu temperaturu ekstrapolacijom.

**1.5.7. Metoda zasićenja gasa23**

*1.5.7.1. Princip metode*

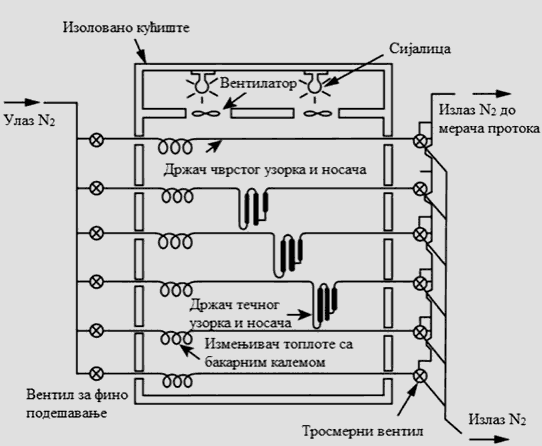
Inertni gas se pri sobnoj temperaturi provodi kroz uzorak ispitivane supstance ili prevodi preko njega poznatom brzinom, koja je dovoljno niska da se postigne zasićenje. Postizanje zasićenja u gasnoj fazi od presudne je važnosti. Supstanca koja se prenosi odvaja se, uglavnom pomoću nosača, i određuje se njena količina. Kao alternativa za odvajanja pare i naknadnu analizu, za kvantitativno određivanje količine prenesene supstance mogu se koristiti analitički postupci, kao što je gasna hromatografija. Kod izračunavanja napona pare polazi se od pretpostavke da važi zakon o idealnom gasu i da je ukupni pritisak smeše gasova jednak zbiru pritisaka komponenata gasa. Parcijalni pritisak ispitivane supstance, tj. napon pare, izračunava se iz poznate ukupne zapremine gasa i mase prenesenog materijala.

Postupak zasićenja gasa primenjuje se na čvrste i tečne supstance. Koristi se za napon pare do najmanje 10-10 Pa**10,11,12,13,14**. Ova metoda je najpouzdanija pri naponima pare ispod 103 Pa. Iznad 103 Pa generalno se dobijaju precenjene vrednosti pritiska pare, verovatno zbog stvaranja aerosola. Budući da se merenja napona pare vrše na sobnoj temperaturi, nema potrebe za ekstrapolacijom podataka od visokih temperatura koja bi mogla dovesti do ozbiljnih grešaka.

*1.5.7.2. Aparatura*

Ovaj postupak zahteva korišćenje kućišta sa stalnom temperaturom. Na Slici 8. koja je data u ovoj metodi prikazano je kućište u koje su smeštena tri držača za čvrste uzorke i tri držača za tečne uzorke, što omogućava istovremenu analizu tri čvrsta uzorka ili tri tečna uzorka. Temperatura se održava u granicama ± 0,5° C ili manje.

Slika 8.



Kao inertni noseći gas obično se koristi azot, ali ponekad je potreban i neki drugi gas**24**. Noseći gas treba da bude suv. Gasna struja se deli na 6 manjih struja, koje se regulišu igličastim ventilima (otvora približno 0,79 mm), i odvodi u kućište bakarnim cevima unutrašnjeg prečnika 3,8 mm. Kad se temperatura ustali, gas protiče kroz uzorak i separator sa nosačem i izlazi iz kućišta.

Čvrsti uzorci stavljaju se u staklenu cevčicu unutrašnjeg prečnika 5 mm između čepova od staklene vune (videti Sliku 9. koja je data u ovoj metodi). Na Slici 10. koja je data u ovoj metodi prikazan je držač tečnog uzorka i sistem nosača. Metoda merenja napona pare tečnosti koja se najlakše ponavlja je da se tečnost nanese na staklene kuglice ili na inertni nosač, kao što je silika gel, i držač napuni tim kuglicama. Druga mogućnost je da se noseći gas prevodi preko grubog metalnog sita i produvava kroz kolonu tečne ispitivane supstance.

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 9. | Slika 10. |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s017.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s018.gif |

Sistem nosača sastoji se od prednjeg i pomoćnog dela. Pri vrlo niskom naponu pare nosač zadržava samo male količine supstance i adsorpcija na staklenoj vuni i staklenoj cevčici između uzorka i nosača može predstavljati ozbiljan problem.

Separatori hlađeni čvrstim CO2 predstavljaju još jedan efikasan način sakupljanja para. Oni ne stvaraju kontrapritisak na koloni za zasićenje, a odvojeni materijal se lako kvantitativno uklanja.

*1.5.7.3. Postupak merenja*

Brzina protoka izlaznog gasa nosača meri se pri sobnoj temperaturi. Tokom eksperimenta često se proverava brzina protoka kako bi se dobila tačna vrednost ukupne zapremine gasa nosača. Poželjno je neprekidno praćenje meračem protoka. Da bi se postiglo zasićenje gasne faze ponekad je potrebno znatno vreme kontakta, što podrazumeva i prilično male brzine protoka gasa**25**.

Na kraju eksperimenta, prednji i pomoćni deo nosača odvojeno se analiziraju. Jedinjenje se iz svakog dela ispira dodavanjem rastvarača. Nastali rastvori kvantitativno se analiziraju radi određivanja isprane mase iz svakog dela. Izbor analitičkog metoda (kao i izbor nosača i rastvarača za ispiranje) zavisi od prirode ispitivanog materijala. Efikasnost ispiranja određuje se ubrizgavanjem poznate količine uzorka na nosač, ispiranjem supstance i analiziranjem dobijene količine. Važno je da se kod provere efikasnosti ispiranja koristi koncentracija koja je jednaka ili slična koncentraciji uzorka u uslovima ispitivanja.

Da bi se osiguralo zasićenje gasa nosača ispitivanom supstancom, koriste se tri različite brzine protoka gasa. Ako se izračunati napon pare ne menja sa promenom brzine protoka, smatra se da je gas zasićen.

Napon pare izračunava se pomoću jednačine:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***p* =** | **W** | **** | ***RT*** |  |  |
| **V** | ***M*** |

pri čemu:

P jeste napon pare (Pa);

W jeste masa isparene ispitivane supstance (g);

V jeste zapremina zasićenog gasa (m3);

R jeste univerzalna gasna konstanta koja iznosi 8,314 (J mol-1 K-1);

T jeste temperatura (K);

M jeste molarna masa ispitivane supstance (g mol-1).

Izmerene zapremine se koriguju za razliku u pritisku i temperaturi između merača protoka i zasićivača.

**1.5.8. Metoda sa rotirajućom kuglicom**

*1.5.8.1. Princip metode*

Kod ove metode koristi se viskozimetar na rotoru čiji se merni element sastoji od male čelične kuglice stabilizovane u magnetnom polju koja se vrti pod uticajem okretnog polja**26,27,28.** Prijemni kalemovi omogućavaju merenje brzine obrtanja. Kada kuglica postigne određenu rotacionu brzinu, obično oko 400 obrtaja u sekundi, prekida se dalje dovođenje energije i nastupa usporavanje usled trenja gasova. Opadanje brzine obrtanja meri se kao funkcija vremena. Napon pare izvodi se iz usporavanja čelične kuglice koje zavisi od pritiska. Preporučeni raspon je od 10-4 Pa do 0,5 Pa.

*1.5.8.2. Aparatura*

Eksperimentalna aparatura prikazana je na Slici 11. koja je data u ovoj metodi. Merna glava postavljena je u termostatski regulisanom kućištu sa tačnošću od 0,1° C. Posuda za uzorak postavljena je u zasebnom, takođe termostatski regulisanom kućištu, sa tačnošću od 0,1° C. Svi ostali delovi aparature drže se na višoj temperaturi kako bi se sprečila kondenzacija. Čitava aparatura spojena je na visokovakuumski sistem.

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 11. |  |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s019.gif | A: Glava senzora na rotoru B: Ćelija za uzorak C: Termostat D: Vakuumski izvod (turbo-pumpa) E: Termostat za vazduh |

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

*2.1. PODACI*

Napon pare kod svake od navedenih metoda određuje se za najmanje dve temperature. Poželjno je odabrati tri ili više temperatura u rasponu od 0° C do 50° C kako bi se proverila linearnost krive napona pare. U slučaju metode efuzije (Knudsenova ćelija i izotermalna termogravimetrija) i metode zasićenja gasa, za merenje se umesto opsega temperature od 0° C do 50° C preporučuje opseg od 120° C do 150° C.

*2.2. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- primenjenoj metodi;

- preciznoj specifikaciji supstance (identitet i nečistoće) i postupku prethodnog prečišćavanja, ukoliko je predviđen;

- najmanje dve vrednosti napona pare i temperature (poželjno je tri ili više) u rasponu od 0° C do 50° C (odnosno od 120° C do 150° C);

- najmanje jedna temperatura treba da bude 25° C ili niža, ako je to tehnički izvodljivo kod odabrane metode;

- svim neobrađenim podacima;

- krivi log p u zavisnosti od 1/T;

- proceni napona pare na 20° C ili 25° C.

Ukoliko se uoči prelazno stanje supstance (izmena u drugo agregatno stanje ili razlaganje), potrebno je navesti podatke o:

- vrsti promene;

- temperaturi na kojoj dolazi do promene pri atmosferskom pritisku;

- naponu pare na 10° C i 20° C ispod temperature prelaska i 10° C i 20° C iznad te temperature (osim u slučaju prelaska iz čvrstog u gasovito stanje).

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe bitne za tumačenje rezultata, naročito u vezi s nečistoćama i agregatnim stanjem supstance.

**3. LITERATURA**

1. Službeni list Evropske zajednice, L 383 A, 26-47 (1992).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Deo drugi**

**DODATAK**

**METODA PROCENE**

**1. UVOD**

Procenjene vrednosti napona pare mogu se koristiti za:

- donošenje odluka o tome koja eksperimentalna metoda je odgovarajuća,

- navođenje procenjene ili granične vrednosti ako se eksperimentalna metoda ne koristi iz tehničkih razloga.

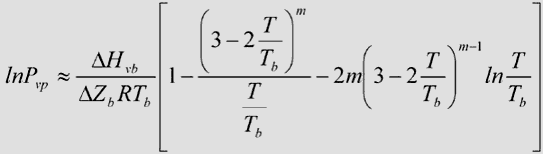
**2. METODA PROCENE**

Napon pare tečnosti i čvrstih supstanci procenjuje se primenom modifikovane Votsonove korelacije**1**. Jedini eksperimentalni podatak koji je potreban jeste normalna tačka ključanja. Metoda se primenjuje u opsegu pritiska od 105 Pa do 10-5 Pa.

Detaljne informacije o ovoj metodi date su u literaturi**2**. Videti i ostalu literaturu**3**.

**3. POSTUPAK IZRAČUNAVANJA**

Napon pare izračunava se na sledeći način:



pri čemu:

T jeste izabrana temperatura;

Tb jeste normalna tačka ključanja;

Pvp jeste napon pare na temperaturi T;

ΔHvb jeste toplota isparavanja;

ΔZb jeste faktor kompresibilnosti (procenjen na 0,97);

m jeste empirijski faktor koji zavisi od agregatnog stanja na relevantnoj temperaturi.

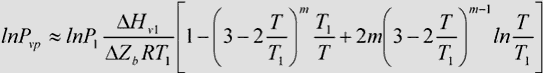
I:

|  |  |
| --- | --- |
| ***Hvb*** = | ***KF*** (8,75)+ ***RinTb*** |
| ***Tb*** |

pri čemu:

KF jeste empirijski faktor koji uzima u obzir polarnost supstance. Faktori KF za nekoliko vrsta spojeva dati su u literaturi**2**.

Mogu se naći podaci gde je data tačka ključanja pri sniženom pritisku. U tom slučaju napon pare izračunava se na sledeći način:



pri čemu:

T1 jeste tačka ključanja pri sniženom pritisku P1.

**4. IZVEŠTAJ**

Kada se koristi metoda procene, u izveštaju se detaljno dokumentuje čitav postupak izračunavanja.

**5. LITERATURA**

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

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

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

**A.5. POVRŠINSKI NAPON**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**. Osnovni principi metode dati su u literaturi**2**.

*1.1. UVOD*

Opisane metode primenjuju se kod merenja površinskog napona vodenih rastvora.

Pre ispitivanja supstance korisno je imati podatke o njenoj: rastvorljivosti u vodi, strukturi, sposobnosti da hidrolizuje i vrednosti kritične koncentracije za formiranje micela.

Opisane metode mogu se primeniti za većinu supstanci, bez ograničenja u pogledu stepena njihove čistoće.

Merenje površinskog napona metodom prstenastog tenziometra ograničeno je na vodene rastvore dinamičkog viskoziteta manjeg od 200 mPa s.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Površinski napon jeste entalpija slobodne površine po jedinici površine.

Površinski napon se izražava kao:

N/m u Međunarodnom sistemu jedinica (SI) ili

mN/m Međunarodnom sistemu jedinica (SI podjedinica);

pri čemu je:

1 N/m = 103 din/cm ili

1 mN/m = 1 din/cm u zastarelom CGS sistemu.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

Referentne supstance koje pokrivaju širok opseg površinskih napona date su u literaturi**1, 3**.

*1.4. PRINCIP METODE*

Metode se zasnivaju na merenju maksimalne sile koju je neophodno vertikalno usmeriti na stremen (uzengiju) ili prsten u kontaktu sa površinom tečnosti koja se ispituje i koja se nalazi u mernoj posudi, da bi se odvojili od te površine ili je usmeriti na ploču čija je ivica u kontaktu sa površinom radi izvlačenja formiranog tankog filma.

Supstance koje su rastvorne u vodi pri najmanjoj koncentraciji od 1 mg/L ispituju se u vodenom rastvoru pri samo jednoj koncentraciji.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ove metode daju veću preciznost od preciznosti koja se očekuje sa aspekta zahteva koji se odnose na životnu sredinu.

*1.6. OPIS METODE*

Pripremi se rastvor supstance u destilovanoj vodi. Koncentracija rastvora treba da bude 90% zasićenog rastvora supstance u vodi. Kada koncentracija prelazi 1 g/L, za ispitivanje se koristi koncentracija od 1 g/L. Supstance čija je rastvorljivost u vodi manja od 1 mg/L ne treba ispitivati.

**1.6.1. Metoda pločice**

Videti standard SRPS H.E 8.047.

**1.6.2. Metoda uzengije**

Videti standard SRPS H.E 8.047.

**1.6.3. Metoda prstena**

Videti standard SRPS H.E 8.047.

**1.6.4. Metoda prstena harmonizovana sa OECD**

*1.6.4.1. Aparat*

Za ovo merenje odgovarajući su komercijalno dostupni tenziometri. Oni se sastoje od sledećih elemenata:

- pokretnog stola za uzorak;

- sistema za merenje sile;

- mernog tela (prsten);

- posude za merenje.

1.6.4.1.1. Pokretni sto za uzorak

Pokretni sto za uzorak koji se koristi kao nosač temperaturno kontrolisane posude za merenje u kojoj se nalazi tečnost koja se ispituje, postavlja se na postolje zajedno sa sistemom za merenje sile.

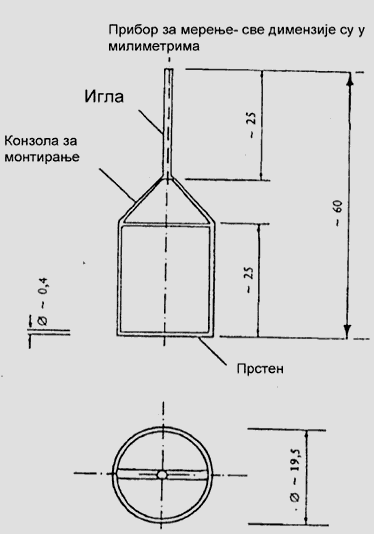
1.6.4.1.2. Sistem za merenje sile

Sistem za merenje sile (videti Sliku) nalazi se iznad stola za uzorak. Greška u merenju sile ne sme prelaziti ± 10-6 N, što odgovara grešci od ± 0,1 mg kod merenja mase. U većini slučajeva, merna skala komercijalno dostupnih tenziometara kalibrisana je u mN/m tako da se površinski napon direktno očitava u mN /m sa tačnošću od 0,1 mN/m.

1.6.4.1.3. Merno telo (prsten)

Prsten je obično napravljen od žice od platine i iridijuma debljine oko 0,4 mm i srednjeg obima od 60 mm. Žičani prsten visi horizontalno sa metalne igle i podupirača (konzole) za postavljanje žice i stvara vezu sa sistemom za merenje sile (videti Sliku).

Slika



1.6.4.1.4. Posuda za merenje

Posuda za merenje u kojoj se nalazi rastvor koji se ispituje treba da bude od stakla sa mogućnošću kontrole temperature. Posuda je tako napravljena da za vreme merenja temperatura tečnosti rastvora koji se ispituje i gasne faze iznad površine ostaje konstantna tako da uzorak ne ispari.

Prihvataju se cilindrični stakleni sudovi čiji unutrašnji prečnik nije manji od 45 mm.

*1.6.4.2. Priprema aparata*

1.6.4.2.1. Čišćenje

Stakleni sudovi se pažljivo čiste. Ukoliko je neophodno, peru se vrelom hrom-sumpornom kiselinom, a nakon toga fosfornom kiselinom (83% do 98% masenih H3PO4). Zatim se stakleni sudovi detaljno ispiraju vodom sa česme i na kraju se ispiraju bi-destilovanom vodom do neutralne reakcije, nakon čega se suše ili ispiraju delom uzorka tečnosti za merenje.

Prsten se prvo obilno ispira vodom da se uklone sve supstance koje su rastvorne u vodi. Prsten se zatim kratko potopi u hrom-sumpornu kiselinu, ispere se bi-destilovanom vodom do neutralne reakcije i na kraju se kratko zagreje iznad plamena metanola.

Napomena: Kontaminacija supstancama koje nisu rastvorene ili uništene hrom-sumpornom ili fosfornom kiselinom, kao što su silikoni, uklanja se pomoću odgovarajućeg organskog rastvarača.

1.6.4.2.2. Kalibracija aparata

Validacija aparata sastoji se od verifikacije i podešavanja nulte tačke tako da pokazivač instrumenta omogućava pouzdano određivanje u mN/m.

Postavljanje: Aparat se niveliše postavljanjem npr. libele na bazu tenziometra, uz podešavanje zavrtnjeva kojima se reguliše nivo postolja.

Podešavanje nulte tačke: Nakon postavljanja prstena na aparat pre potapanja u tečnost, pokazivač tenziometra se podešava na nulu, a prsten se podešava paralelno sa površinom tečnosti. U tu svrhu, površina tečnosti služi kao ogledalo.

Kalibracija: Kalibracija se vrši pomoću dva postupka:

a) Korišćenjem mase: procedura koja koristi jahače poznatih masa između 0,1 g i 1,0 g na prstenu.

Faktor kalibracije (Fa), sa kojim se sva očitavanja množe, određuje se pomoću jednačine**1**:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **F*a*** = | ***r*** |  |
| ***a*** |  |

pri čemu je:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***r*** = | ***mg*** | **(*mN* / *m*)** |
| **2*b*** |

pri čemu:

*m* jeste masa jahača (dopune), izražena u *g*;

*g* jeste gravitaciono ubrzanje (981 cm s-2 na nivou mora);

*b* jeste srednji obim prstena, izražen u cm;

*sa* jeste očitavanje tenziometra nakom postavljanja jahača na prsten, izraženo u mN/m.

b) Korišćenjem vode: postupak koji koristi čistu vodu čiji je površinski napon na npr. temperaturi od 23° C jednak 72,3 mN/m. Ovaj postupak se obavlja brže od kalibracije masom, ali uvek postoji opasnost da je površinski napon vode lažan usled ostataka kontaminacije surfaktantima.

Kalibracioni faktor (*Fb*), sa kojim se množe sva očitavanja sa instrumenta, određuje se pomoću jednačine**2**:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **F**b = | ****o |  |
| ***g*** |  |

pri čemu:

*s*o jeste vrednost iz literature za površinski napon vode (mN/m);

*s*g jeste izmerena vrednost površinskog napona vode (mN/m), obe pri istoj temperaturi.

*1.6.4.3. Priprema uzoraka*

Od supstanci koje se ispituju pripremaju se vodeni rastvori u zahtevanim koncentracijama. Ne smeju sadržati nikakve nerastvorne supstance.

Rastvor se održava na konstantnoj temperaturi (± 0,5° C). Pošto se površinski napon rastvora u mernom sudu menja vremenom, vrši se nekoliko merenja u različitim vremenskim intervalima, pri čemu iscrtana kriva pokazuje površinski napon kao funkciju vremena. Kada promene prestanu da se dešavaju, postiže se stanje ravnoteže.

Kontaminacija prašinom i gasovima sa drugih supstanci utiče na merenje. Zbog navedenog merenje se odvija ispod zaštitnog poklopca.

**1.6.5. Uslovi ispitivanja**

Merenje se vrši na temperaturi od približno 20° C i kontroliše se u okviru ± 0,5° C.

**1.6.6. Ispitivanje**

Rastvori koji se mere prenose se u pažljivo opranu posudu za merenje, vodeći računa da se izbegne stvaranje pene, nakon čega se posuda za merenje postavlja na sto aparata za ispitivanje. Vrh table sa mernim sudom se zatim izdiže sve dok prsten ne zaroni ispod površine rastvora koji se meri. Nakon toga, vrh table se postepeno i ravnomerno spušta (brzinom od oko 0,5 cm/min) da bi se prsten odvojio od površine do postizanja maksimalne sile. Tečni sloj koji je zalepljen na prsten ne sme se odvajati od prstena. Nakon završenog merenja, prsten se ponovo zaranja ispod površine, a merenje se ponavlja dok se ne postigne konstantna vrednost površinskog napona. Za svako određivanje beleži se vreme od prenošenja rastvora u merni sud. Očitavanje se vrši pri maksimalnoj sili potrebnoj da se prsten odvoji od površine tečnosti.

**2. PODACI**

Radi izračunavanja površinskog napona, očitana vrednost u mN/m na aparatu se prvo množi sa faktorom kalibracije Fa ili Fb (u zavisnosti od toga koji postupak kalibracije je korišćen). Navedeni postupak daje vrednost koja se primenjuje samo približno, te stoga zahteva korekciju.

Harkins i Džordan**4** su empirijski utvrdili faktore korekcije za vrednosti površinskog napona izmerene metodom prstena, koji zavise od: dimenzija prstena, gustine tečnosti i njenog površinskog napona.

Iz tabela Harkinsa i Džordana teško je utvrditi faktor korekcije za svako individualno merenje, te se za proračun površinskog napona za vodene rastvore koristi i pojednostavljena procedura očitavanja korektivnih vrednosti površinskog napona direktno iz tabele.

Za očitavanja koja se nalaze između tabelarnih vrednosti koristi se interpolacija.

Tabela: Korekcija izmerenog površinskog napona

Samo za vodene rastvore, *r* = 1 g/cm3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *r* | 9,55 mm (prosečan poluprečnik prstena) |  |
| *r* | 0,185 mm (poluprečnik žice prstena) |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Eksperimentalna vrednost (mN/m) | Korigovana vrednost (mN/m) | |
| Kalibracija jahačem (videti odeljak 1.6.4.2.2.a) ove metode) | Kalibracija vodom (videti odeljak 1.6.4.2.2.b) ove metode) |
| 20 | 16,9 | 18,1 |
| 22 | 18,7 | 20,1 |
| 24 | 20,6 | 22,1 |
| 26 | 22,4 | 24,1 |
| 28 | 24,3 | 26,1 |
| 30 | 26,2 | 28,1 |
| 32 | 28,1 | 30,1 |
| 34 | 29,9 | 32,1 |
| 36 | 31,8 | 34,1 |
| 38 | 33,7 | 36,1 |
| 40 | 35,6 | 38,2 |
| 42 | 37,6 | 40,3 |
| 44 | 39,5 | 42,3 |
| 46 | 41,4 | 44,4 |
| 48 | 43,4 | 46,5 |
| 50 | 45,3 | 48,6 |
| 52 | 47,3 | 50,7 |
| 54 | 49,3 | 52,8 |

Tabela je izrađena na osnovu Harkins-Džordanove korekcije**XXIII**.

Alternativno, bez prethodne kalibracije, površinski napon se izračunava prema formuli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ** =** | ***xF*** |  |
| ***4R*** |  |

pri čemu:

*F* jeste sila izmerena dinamometrom u tački prekida prevlake (filma);

*R* jeste poluprečnik prstena;

 jeste korektivni faktor**1**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXIII** Slična je tabeli koja je data u DIN standardu (DIN 53914) za vodu i vodene rastvore (gustine *r* = 1 g/cm3) i za komercijalno dostupan prsten dimenzija *R* = 9,55 mm (srednji poluprečnik prstena) i *r* = 0,185 mm (poluprečnik žice prstena). Tabela sadrži korigovane vrednosti za merenja površinskog napona nakon kalibracije jahačem ili vodom.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;

- vrsti vode ili rastvora koji je korišćen;

- tačnom opisu supstance (identitet i nečistoće);

- rezultatima merenja: površinskog napona (očitavanje) sa navedenim pojedinačnim očitavanjima i njihovom aritmetičkom srednjom vrednošću, kao i sa korigovanom srednjom vrednošću (uzimajući u obzir faktor opreme i tabelu korekcije);

- koncentraciji rastvora;

- temperaturi ispitivanja;

- starosti korišćenog rastvora; naročito vreme između pripreme i merenja rastvora;

- opisu vremenske zavisnosti površinskog napona nakon prenosa rastvora u merni sud.

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Imajući u vidu da destilovana voda ima površinski napon 72,75 mN/m na temperaturi od 20° C, supstance koje imaju površinski napon niži od 60 mN/m u uslovima ove metode smatraju se površinski aktivnim.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.

4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

**A.6. RASTVORLJIVOST U VODI**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**.

*1.1. UVOD*

Korisno je imati podatke o: strukturnoj formuli, naponu pare, konstanti disocijacije i hidrolizi (u funkciji pH vrednosti) supstance koja se ispituje.

Pojedinačne metode ne mogu obuhvatiti ceo opseg rastvorljivosti u vodi.

Dve metode ispitivanja pokrivaju ceo opseg rastvorljivosti u vodi, ali se ne mogu primeniti na isparljive supstance:

- jedna metoda se primenjuje na čiste supstance koje imaju malu rastvorljivost (< 10-2 g/L) i koje su stabilne u vodi, a naziva se: "Metoda eluiranja sa kolone";

- druga metoda se odnosi na čiste supstance sa većom rastvorljivošću (> 10-2 g/L) i koje su stabilne u vodi, a naziva se: "Metoda staklenog suda".

Prisustvo nečistoća može značajno uticati na rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Rastvorljivost supstance u vodi određena je masenom koncentracijom supstance u zasićenom vodenom rastvoru na određenoj temperaturi.

Rastvorljivost u vodi izražava se jedinicama mase po zapremini rastvora. Merna jedinica u Međunarodnom sistemu jedinica (SI) sistema je kg/m3 (mogu se koristiti i g/L).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

*1.4. PRINCIP METODE*

Preliminarnim ispitivanjima se utvrđuje približna količina uzorka i vreme neophodno da se postigne koncentracija zasićenog rastvora.

**1.4.1. Metoda eluiranja sa kolone**

Ova metoda zasniva se na eluiranju ispitivane supstance vodom iz mikrokolone koja je napunjena inertnim materijalom, kao što su granule stakla ili pesak, koji je prekriven supstancom koja se ispituje. Rastvorljivost u vodi određuje se kada masena koncentracija eluata postane konstantna. Rezultati se navode kao plato koncentracije u funkciji vremena.

**1.4.2. Metoda staklenog suda**

Kod ovog postupka supstanca (čvrste supstance treba da budu sprašene) se rastvara u vodi na temperaturi nešto višoj od temperature ispitivanja. Kada dođe do zasićenja, smeša se hladi i ostavlja da stoji na temperaturi na kojoj se vrši ispitivanje, uz mešanje dok se ne postigne ravnoteža. Merenje se vrši i direktno na temperaturi na kojoj se ispituje, ukoliko se odgovarajućim uzorkovanjem potvrdi da je postignuto ravnotežno zasićenje. Nakon toga, primenom odgovarajuće analitičke metode, utvrđuje se masena koncentracija supstance u vodenom rastvoru koji ne sme sadržavati nerastvorne čestice.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.5.1. Ponovljivost**

Kod metode eluiranja sa kolone može se dobiti rezultat < 30%, a kod metode staklenog suda očekivani rezultat je < 15%.

**1.5.2. Osetljivost**

Osetljivost zavisi od metode analize, ali moguće je odrediti masene koncentracije do 10-6 g/L.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Uslovi ispitivanja**

Ispitivanje se najčešće sprovodi na temperaturi od 20° C ± 0,5° C. Ukoliko se posumnja da rastvorljivost zavisi od temperature (> 3% po° C), rastvorljivost se ispituje na još dve temperature koje su najmanje za 10° C niže ili više od početne temperature. U tom slučaju kontrola temperature treba da bude u opsegu ± 0,1° C. Izabrana temperatura treba da bude konstantna u svim važnim delovima opreme.

**1.6.2. Preliminarna ispitivanja**

Približno 0,1 g uzorka (čvrste supstance treba da budu sprašene) prenese se u graduisanu menzuru sa staklenim zapušačem (zapremine 10 mL) i dodaju se postepeno povećane zapremine destilovane vode na sobnoj temperaturi u koracima datim u tabeli:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0,1 g rastvoren u "x" mL vode | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 10 | 100 | > 100 |
| Približno utvrđena rastvorljivost (g/L) | > 1000 | 1000 do 200 | 200 do 1000 | 100 do 50 | 50 do 10 | 10 do 1 | < 1 |

Nakon svakog dodavanja navedene količine vode, smeša se snažno mućka 10 minuta i vizuelno se proverava da li ima nerastvornih delova uzorka. Ukoliko nakon dodavanja 10 mL vode uzorak ili neki njegovi delovi ostaju nerastvoreni, eksperiment se ponavlja u menzuri zapremine 100 mL sa većim zapreminama vode. Kod supstanci koje su slabo rastvorne u vodi vreme koje je neophodno da bi se rastvorila supstanca može biti znatno duže (najmanje 24 sata). Približna vrednost rastvorljivosti iz Tabele odnosi se na zapreminu vode koja je nešto malo ispod one vrednosti pri kojoj dolazi do potpunog rastvaranja supstance. Ukoliko je očigledno da se supstanca nije do kraja rastvorila, ostavlja se da se rastvara duže od 24 sata (maksimum 96 sati) ili se vrše dalja razblaživanja kako bi se potvrdilo da li je za korišćenje pogodnija metoda eluiranja sa kolone ili metoda staklenog suda.

**1.6.3. Metoda eluiranja sa kolone**

*1.6.3.1. Nosač, rastvarač i eluent*

Nosač koji se koristi kod metode eluiranja sa kolone treba da bude inertan. Materijali koji se mogu koristiti su staklene kuglice i pesak. Za nanošenje uzorka na nosač koriste se isparljivi rastvarači analitičke čistoće. Za eluiranje se koristi bi-destilovana voda koja je destilovana u staklenoj ili kvarcnoj aparaturi.

Napomena: Demineralizovana voda koja dolazi sa organskog jonoizmenjivača ne sme se koristiti.

*1.6.3.2. Nanošenje supstance na nosač*

Oko 600 mg nosača izmeri se i unese u balon sa okruglim dnom zapremine 50 mL. Odgovarajuća, precizno izmerena količina supstance koja se ispituje rastvori se u izabranom rastvaraču. Odgovarajuća količina ovog rastvora dodaje se na nosač. Rastvarač se u potpunosti upari npr. upotrebom rotacionog vakuum uparivača. U suprotnom, ne postiže se optimalna vlažnost podloge zbog efekta raspodele na površini nosača.

Punjenje nosača proizvodi probleme (netačne rezultate) ukoliko se supstanca koja se ispituje deponuje u obliku ulja ili u različitoj kristalnoj fazi. Ovaj problem se ispituje kroz eksperimente i sačinjava se detaljan izveštaj o tome.

Nosač se ostavi da se natapa oko dva sata u 5 mL vode, a potom se suspenzija prenosi u mikrokolonu. Alternativno, u mikrokolonu koja je napunjena vodom sipa se osušeni nosač koji se ostavi u koloni oko dva sata da se uravnoteži.

Postupak ispitivanja:

Eluiranje supstance sa nosača izvodi se:

- pomoću recirkulacione pumpe (videti Sliku 1) ili

- pomoću suda za nivelisanje (videti Sliku 4).

*1.6.3.3. Metoda eluiranja sa kolone pomoću recirkulacione pumpe*

Aparatura

Šematski prikaz opreme dat je na Slici 1. Odgovarajuća mikrokolona prikazana je na Slici 2, iako je prihvatljiva bilo koja veličina koja ispunjava kriterijume koji se odnose ne reproduktivnost i osetljivost. Kolona treba da ima dovoljno mesta za najmanje pet zapremina vode i da može da izdrži pet uzoraka. Veličina kolone se može smanjiti ukoliko se koristi pripremljeni rastvor koji zamenjuje pet zapremina koje se koriste za uklanjanje nečistoća.

Kolona se povezuje sa recirkulacionom pumpom sa kontrolisanim protokom oko 25 mL/h. Pumpa se povezuje pomoću politetrafluoretilenskih (u daljem tekstu: PTFE) i/ili staklenih konektora. Kolona i pumpa, kada se sastave, treba da imaju mogućnost uzorkovanja efluenta i izjednačavanja pritiska. Materijal u koloni zadržava mali čep (5 mm) od staklene vune koji služi i kao filter za čestice nečistoća. Pumpa je peristaltička pumpa ili membranska puma (vodi se računa da ne dođe da zagađenja i/ili apsorpcije materijala iz cevi).

Merenje

Početi protok kroz kolonu. Preporučuje se da se koristi protok od oko 25 mL/h (to odgovara 10 zapremina/h za kolonu koja je opisana). Prvih pet zapremina (minimum) odbaciti kako bi se sa njima izdvojile nečistoće rastvorne u vodi. Nakon toga pumpa se ostavlja da radi sve dok se ne postigne ravnoteža. Smatra se da je uspostavljena ravnoteža kada se u pet nasumično uzetih uzastopnih uzoraka koncentracije ne razlikuju za više od ± 30%. Ovi uzorci se razdvajaju jedni od drugih po vremenskim intervalima koji odgovaraju prolasku najmanje 10 zapremina eluenta.

*1.6.3.4. Metoda eluiranja sa kolone pomoću suda za nivelisanje*

Aparatura (videti Slike 4 i 3)

Sud za nivelisanje: Spajanje sa sudom za nivelisanje vrši se upotrebom šlifovanog spoja koji je povezan pomoću cevi od PTFE. Preporučuje se da se koristi protok od oko 25 mLl/h. Prikupljene frakcije analiziraju se izabranom metodom.

Merenje

Frakcije koje pripadaju srednjem opsegu elucije, kada su koncentracije konstantne (± 30%) u najmanje pet uzastopnih frakcija, koriste se da bi se odredila rastvorljivost u vodi.

U oba slučaja (kada se koristi pumpa ili posuda za nivelisanje) se ispituje rastvorljivost sa upola manjim protokom u odnosu na prvo ispitivanje. Ukoliko se rezultati dva ispitivanja slažu, rezultat je zadovoljavajući. Ukoliko je rastvorljivost očigledno veća pri manjem protoku, nastavlja se prepolovljavanje brzine protoka sve dok dva sukcesivna ispitivanja ne daju približne rezultate.

U oba slučaja (kada se koristi pumpa ili posuda za nivelisanje) frakcije se proveravaju na sadržaj koloidnih čestica Tindalovim efektom (raspršavanjem snopa svetlosti). Prisustvo koloidnih čestica menja rezultate i ispitivanje se ponavlja uz poboljšano filtriranje kroz kolonu.

Potrebno je izmeriti pH vrednost svakog uzorka. Ispitivanje pri manjem protoku izvodi se pri istoj temperaturi.

**1.6.4. Metoda staklenog suda**

*1.6.4.1. Oprema*

Za primenu metode staklenog suda potrebno je:

- uobičajeno laboratorijsko posuđe od stakla i instrumenti;

- uređaj pogodan za mešanje rastvora pri kontrolisanim konstantnim temperaturama;

- centrifuga (poželjno termostatirana), ukoliko se radi sa emulzijama;

- oprema za analitičko određivanje.

*1.6.4.2. Merenje*

Količina potrebnog materijala da bi se postiglo zasićenje željene zapremine vode utvrđuje se na osnovu preliminarnog ispitivanja. Zapremina vode koja je neophodna zavisi od primenjene analitičke metode i opsega rastvorljivosti. Količina materijala (oko pet puta veća od one koja je utvrđena preliminarnim ispitivanjem) odmeri se i stavi u svaku od tri staklene posude koje imaju staklene zapušače (npr. epruvete ili kivete za centrifugiranje, baloni). Određena količina vode dodaje se u svaku posudu i one se čvrsto zatvore. Zatvorene posude potom se mešaju na temperaturi od 30° C. (Koristi se uređaj koji meša pri konstantnoj temperaturi, npr. magnetno mešanje u termostatiranom vodenom kupatilu). Nakon jednog dana, jedna od posuda se uklanja i ostavi se, uz povremeno mešanje, na temperaturi na kojoj se izvodi ispitivanje tokom 24 sata da bi se uspostavila ravnoteža. Sadržaj posude se zatim centrifugira na temperaturi na kojoj se vrši ispitivanje i određuje se koncentracija supstance u vodenoj fazi upotrebom odgovarajuće analitičke metode. Preostale dve posude prolaze kroz isti postupak nakon početnog ujednačavanja pri temperaturi od 30° C u roku od dva odnosno tri dana. Ukoliko se koncentracije iz najmanje dve posude slažu sa željenom ponovljivošću, smatra se da je ispitivanje zadovoljilo kriterijume. Ispitivanje se ponavlja, uz duže vreme uspostavljanja ravnoteže, ukoliko rezultati iz posuda 1, 2 i 3 pokazuju tendenciju povećanja vrednosti.

Merenje se vrši bez perioda inkubacije na temperaturi od 30° C. Da bi se odredila brzina uspostavljanje ravnoteže zasićenja, uzorci se uzimaju do trenutka kada vreme mešanja više ne utiče na koncentraciju ispitivanog rastvora.

Potrebno je zabeležiti pH vrednost svakog uzorka.

**1.6.5. Analiza**

Pri ovim određivanjima za svaku određenu supstancu potrebno je primeniti analitičku metodu koja je za nju odgovarajuća, s obzirom da male količine rastvorenih nečistoća mogu dovesti do velikih grešaka u određivanju rastvorljivosti. Metode koje se primenjuju mogu biti: gasna ili tečna hromatografija, metode titracije, fotometrijske metode, voltametrijske metode.

**2. PODACI**

*2.1. METODA ELUIRANJA SA KOLONE*

Potrebno je izračunati srednju vrednost za najmanje pet uzastopnih uzoraka uzetih iz posude u kojoj se nalaze zasićeni rastvori, kao i vrednost standardne devijacije. Rezultati se prikazuju u jedinicama mase po zapremini rastvora.

Srednje vrednosti izračunate za dva ispitivanja u kojima se koriste različite brzine protoka se upoređuju i treba da imaju ponovljivost manju od 30%.

*2.2. METODA STAKLENOG SUDA*

Prikazuju se pojedinačni rezultati za svaku od posuda i ukoliko su ovi rezultati konstantni (ponovljivost manja od 15%), treba izračunati njihovu srednju vrednost i izraziti je u jedinicama masa po zapremini rastvora. Ovo zahteva pretvaranje masenih jedinica u zapreminske jedinice, korišćenjem gustine kada je rastvorljivost veoma velika (> 100 g/L).

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. METODA ELUIRANJA SA KOLONE*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- rezultatima preliminarnih ispitivanja;

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);

- pojedinačnim koncentracijama, brzini protoka i pH vrednosti za svaki uzorak;

- srednjoj vrednosti i standardnoj devijaciji najmanje pet uzoraka iz područja zasićenja za svako ispitivanje;

- prosečnoj vrednosti dva uzastopna, prihvatljiva ispitivanja;

- temperaturi vode pri pravljenju zasićenog rastvora;

- korišćenoj metodi analize;

- materijalu nosača;

- načinu nanošenja uzorka na nosač;

- korišćenom rastvaraču;

- evidenciji, ako je došlo do hemijske nestabilnosti supstance za vreme ispitivanja i korišćenoj metodi.

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

*3.2. METODA STAKLENOG SUDA*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- rezultatima preliminarnog ispitivanja;

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);

- pojedinačnim analitičkim određivanjima i srednjoj vrednosti kada je određeno više od jedne vrednosti za svaku posudu;

- pH vrednosti svakog uzorka;

- temperaturi na kojoj je vršeno ispitivanje;

- prosečnoj vrednosti rezultata od različitih posuda, a koji su u saglasnosti;

- korišćenoj analitičkoj metodi;

- evidenciji, ako je došlo do hemijske nestabilnosti supstance za vreme ispitivanja i korišćenoj metodi.

U izveštaju se navode svi podaci i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

**4. LITERATURA**

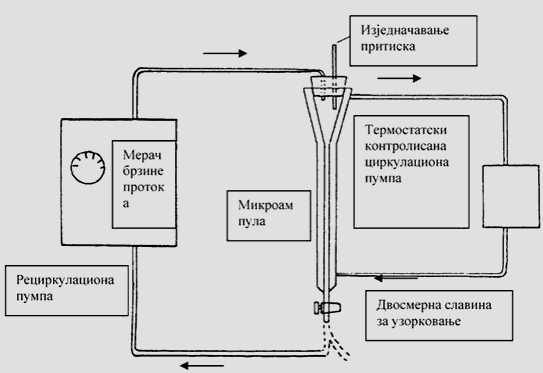
1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

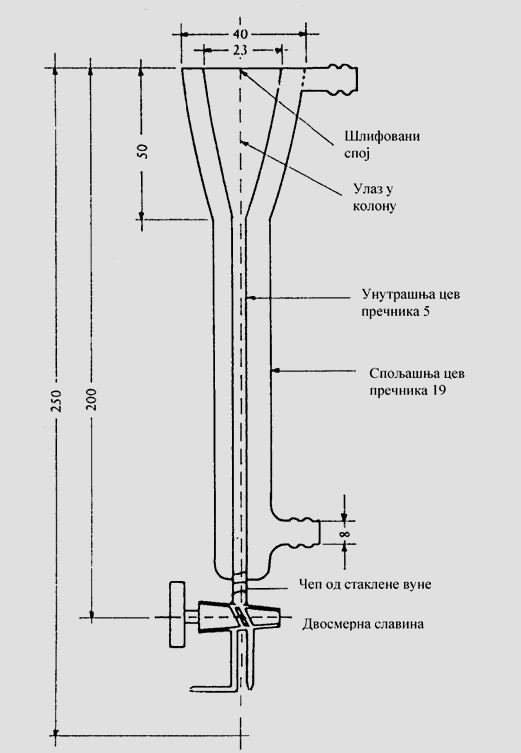
3. NF T 20-046 (AFNOR) (September 85) Chemical products for industrial use - Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility - Flask method.

Deo drugi

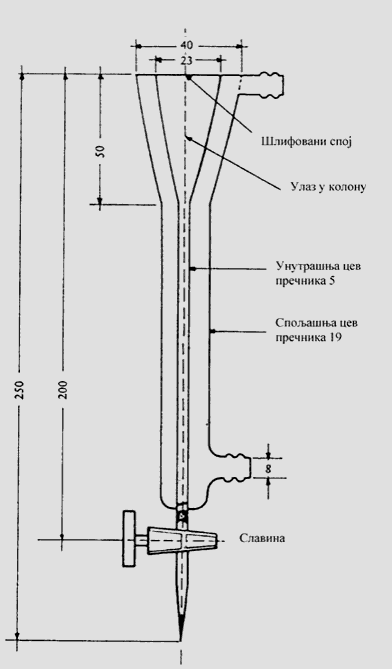
Slika 1: Metoda eluiranja sa kolone pomoću recirkulacione pumpe



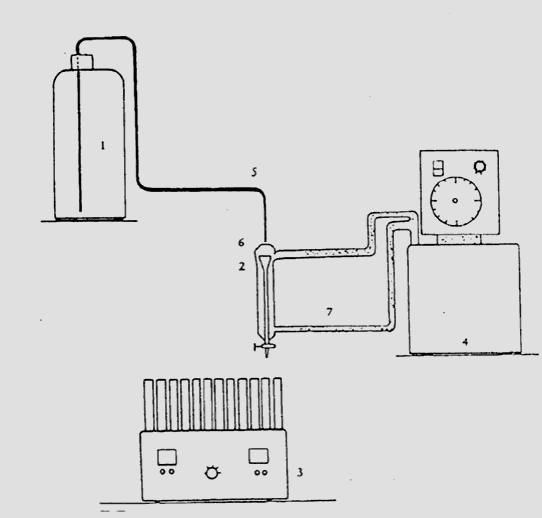
Slika 2: Tipična mikrokolona (sve dimenzije date su u milimetrima)



Slika 3: Tipična mikrokolona (sve dimenzije date su u milimetrima)



Slika 4: Metoda eluiranja sa kolone pomoću suda za nivelisanje



Pri čemu je:

1. Posuda za nivelaciju (npr. boca zapremine 2,5 L);  
2. Kolona (videti Sliku 3);  
3. Kolektor frakcija;  
4. Termostat;  
5. Teflonska cev;  
6. Šlifovani spoj;  
7. Cev za vodu (između termostata i kolone, unutrašnjeg prečnika: približno 8 mm).

**A.8. KOEFICIJENT RASPODELE**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda mućkanja u staklenom balonu zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD**1**.

*1.1. UVOD*

Korisno je imati preliminarne podatke o: strukturnoj formuli, konstanti disocijacije, rastvorljivosti u vodi, hidrolizi, rastvorljivosti u *n*-oktanolu i površinskom naponu supstance koja se ispituje.

Kod supstanci koje jonizuju ispitivanja se sprovode na njihovim nejonizovanim oblicima (slobodne kiseline ili slobodne baze) što se postiže upotrebom odgovarajućeg pufera čija je pH vrednost najmanje za jednu jedinicu ispod (slobodne kiseline) ili iznad (slobodne baze) pK.

Ova metoda ispitivanja obuhvata dve različite metode: metodu mućkanja u staklenom balonu i visoko efikasnu tečnu hromatografiju (High performance liquid chromatography, u daljem tekstu: HPLC). Metoda mućkanja u staklenom balonu koristi se kada se vrednost log Pow (videti objašnjenje dato u ovoj metodi) nalazi u opsegu od - 2 do 4. Metoda tečne hromatografije koristi se kada se vrednost log Pow nalazi u opsegu od 0 do 6. Pre nego što se pristupi sprovođenju bilo koje od ove dve metode potrebno je odrediti preliminarne procene koeficijenta raspodele.

Metoda mućkanja u staklenom balonu primenjuje se samo za čiste supstance rastvorne u vodi i *n*-oktanolu. Metoda se ne primenjuje za površinski aktivne supstance (za njih se daje izračunati ili procenjeni koeficijent raspodele koji se zasniva na rastvorljivosti u vodi i u *n*-oktanolu).

Metoda tečne hromatografije (u daljem tekstu: HPLC metoda) ne primenjuje se na jake kiseline i baze, komplekse metala, površinski aktivne supstance i supstance koje reaguju sa eluentom. Za ove supstance se izračunava ili procenjuje koeficijent raspodele koji se zasniva na rastvorljivosti u vodi i u *n*-oktanolu.

Metoda tečne hromatografije manje je osetljiva na prisutne nečistoće u ispitivanom jedinjenju u odnosu na postupak mućkanja u staklenom balonu. Ponekad prisustvo nečistoća utiče na tumačenje rezultata jer položaj pikova postaje nesiguran. Kod smeša kod kojih se ne razdvajaju trake u hromatogramu, navodi se gornji i donji limit log P.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Koeficijent raspodele (P) jeste odnos ravnotežnih koncentracija (ci) rastvorene supstance u dvofaznom sistemu koji se sastoji od dva rastvarača koji se ne mešaju. U slučaju *n*-oktanola i vode:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pow = | C n-oktanol |  |
| C voda |  |

Koeficijent raspodele (P) jeste količnik dve koncentracije, koji se uobičajeno izražava u vidu logaritamske vrednosti sa osnovom 10 (log P).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

**1.3.1. Metoda mućkanja u staklenom balonu**

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

**1.3.2. Metoda tečne hromatografije**

Da bi se uspostavila korelacija između izmerenih HPLC vrednosti supstance i njihovih P vrednosti, konstruiše se kalibraciona kriva zavisnosti log P od hromatografskih podataka sa najmanje 6 referentnih tačaka. Korisnik bira odgovarajuću referentnu supstancu. Ako je moguće, najmanje jedna referentna supstanca ima Pow veći od Pow supstance koja se ispituje i jedna referentna supstanca ima Pow manji od supstance koja se ispituje. Za vrednosti log P manje od 4 kalibracija se zasniva na podacima dobijenim primenom metode mućkanja u staklenom balonu. Za vrednosti log P veće od 4 kalibracija se zasniva na validiranim vrednostima datim u literaturi ukoliko se one podudaraju sa izračunatim vrednostima. Za postizanje bolje preciznosti, najbolje je kao referentne supstance uzeti one supstance koje su slične strukture kao supstanca koja se ispituje.

Vrednosti log Pow dostupne su za mnoga hemijska jedinjenja**2, 3**. Ukoliko ne postoje podaci o koeficijentu raspodele za strukturno slične supstance, pravi se opštija kalibraciona kriva na osnovu podataka o drugim referentnim supstancama.

Spisak preporučenih referentnih supstanci i njihovih log Pow vrednosti dat je u Delu drugom ove metode.

*1.4. PRINCIP METODE*

**1.4.1. Metoda mućkanja u staklenom balonu**

Da bi se odredio koeficijent raspodele, treba postići ravnotežu između svih komponenti sistema i odrediti koncentracije rastvorene supstance u obe faze. Literatura upućuje da se u te svrhe koristi nekoliko različitih tehnika, npr. mešanje dve faze koje se potom razdvajaju kako bi se utvrdile ravnotežne koncentracije ispitivane supstance.

**1.4.2. Metoda tečne hromatografije**

HPLC se izvodi na analitičkim kolonama pakovanim sa komercijalno dostupnom čvrstom fazom koja sadrži duge lance ugljovodonika (npr. C8, C18) koji su hemijski vezani na silicijum dioksid. Hemikalije nanete na takve kolone kreću se kroz njih različitim brzinama zbog različite raspodele između mobilne faze i ugljovodonične stacionarne faze. Smeše hemikalija razdvajaju se prema njihovoj hidrofobnosti, pri čemu se hemijska jedinjenja koja su rastvorna u vodi izdvajaju prva, a poslednja se izdvajaju ona koja se rastvaraju u uljima, proporcionalno njihovom koeficijentu raspodele ugljovodonik - voda. Ovo omogućava da se ustanovi veza između retencionog vremena na takvoj koloni (reversno-faznoj) i koeficijenta raspodele za sistem *n*-oktanol/voda. Koeficijent raspodele se izvodi iz faktora kapaciteta *k*, koji je dat u jednačini:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| k = | tr - to |  |
| to |

pri čemu:

*t*r jeste retenciono vreme supstance koja se ispituje;

*t*o jeste prosečno vreme koje je potrebno molekulu rastvarača da prođe kroz kolonu (mrtvo vreme).

Nije potrebna primena kvantitativnih analitičkih metoda. Potrebno je odrediti vreme elucije.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.5.1. Ponovljivost**

Metoda mućkanja u staklenom balonu

U cilju obezbeđivanja tačnosti particionog koeficijenta, neophodno je vršiti po dva određivanja na tri različita uslova ispitivanja pri čemu količina supstance kao i odnos između zapremina rastvarača može da varira. Utvrđene vrednosti particionih koeficijenata izražene u logaritmima treba da budu u okviru ± 0,3 jedinice.

HPLC metoda

U cilju obezbeđivanja poverenja u rezultate merenja vrše se dva ispitivanja. Vrednosti log P izvedene iz pojedinačnih merenja nalaze se u opsegu od ± 0,1 jedinice log P.

**1.5.2. Osetljivost**

Metoda mućkanja u staklenom balonu

Opseg merenja ove metode određuje detekcioni limit analitičkog postupka. Detekcioni limit omogućava određivanje vrednosti log Pow u opsegu od - 2 do 4 (kada postoje uslovi, opseg se može proširiti na vrednosti log Pow do 5) kada koncentracija rastvorene supstance u bilo kom od rastvarača nije veća od 0,01 mol/L.

HPLC metoda

HPLC metoda omogućava određivanje koeficijenta raspodele u opsegu log Pow od 0 do 6.

Koeficijent raspodele jedinjenja u normalnim okolnostima utvrđuje se uz varijaciju od ± 1 log Pow jedinice vrednosti dobijene mućkanjem u staklenom balonu. Načini za uspostavljanje korelacije između ovih vrednosti mogu se naći u literaturi**4, 5, 6, 7, 8**. Veća tačnost postiže se kada se korelacija vrši preko strukturno sličnih referentnih jedinjenja**9**.

**1.5.3. Specifičnosti**

Metoda mućkanja u staklenom balonu

Nernstov zakon raspodele primenjuje se samo pri konstantnoj temperaturi, pritisku i pH vrednosti za razblažene rastvore. Primenjuje se samo na čiste supstance raspodeljene između dva čista rastvarača. Prisustvo više različitih rastvorenih supstanci u jednom ili oba rastvarača u isto vreme utiče na rezultate.

Disocijacija ili asocijacija rastvorenih molekula dovodi do odstupanja od Nernstovog zakona raspodele. Na ova odstupanja ukazuje pojava zavisnosti koeficijenta raspodele od koncentracije rastvora.

Zbog postojanja većeg broj ravnoteža, ova metoda se ne primenjuje bez prethodne korekcije na supstance koje jonizuju. Kod ovakvih jedinjenja razmatra se upotreba pufera umesto vode. pH vrednost pufera treba da se razlikuje najmanje za jednu pH jedinicu od pKa supstance i vodi se računa o uticaju te pH vrednosti na životnu sredinu.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Preliminarna procena koeficijenta raspodele**

Koeficijent raspodele se najbolje procenjuje primenom računske metode (videti Deo drugi ove metode) ili, kada je moguće, iz odnosa rastvorljivosti ispitivane supstance u čistim rastvaračima**10**.

**1.6.2. Metoda mućkanja u staklenom balonu**

*1.6.2.1. Priprema*

*n-*oktanol: Za određivanje koeficijenta raspodele koriste se rastvarači visoke čistoće (analitičke čistoće).

Voda: Koristi se destilovana ili bidestilovana voda koja je destilovana u staklenoj ili kvarcnoj aparaturi. Za jedinjenja koje jonizuju koriste se puferski rastvori umesto vode ukoliko je opravdano.

Napomena: Ne koristi se voda koja je prečišćena na jonoizmenjivaču.

1.6.2.1.1. Predzasićenje rastvarača

Pre nego što se pristupi određivanju particionog koeficijenta, rastvarači se zasićuju uzajamno, mućkanjem na temperaturi na kojoj se izvodi eksperiment. Ovo je najbolje uraditi tako što se u dve velike boce u kojima se čuvaju analitički *n-*oktanol visoke čistoće ili voda doda dovoljna količina onog drugog rastvarača i mućka u mehaničkom šejkeru 24 sata, nakon čega odstoje sve dok se dva rastvarača ne razdvoje i ne dostigne zasićenje.

1.6.2.1.2. Priprema za ispitivanje

Ukupna količina dva rastvarača treba da skoro napuni sud. Ovako se sprečava gubitak ispitivanog jedinjenja usled isparavanja. Odnos zapremine i količine supstance koja se ispituje određen je:

- preliminarnom procenom koeficijenta raspodele (videti dato objašnjenje);

- minimalnom količinom supstance koja se ispituje neophodnom za analitički postupak i

- ograničenjima koja se odnose na maksimalnu koncentraciju u oba rastvarača od 0,01 mola po litru.

Sprovode se tri ispitivanja. U prvom ispitivanju koristi se izračunat odnos zapremine *n*-oktanola prema vodi. U drugom ispitivanju ovaj odnos se deli sa dva. U trećem ispitivanju ovaj odnos množi se sa dva (npr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Ispitivana supstanca

Osnovni rastvor se priprema u *n*-oktanolu zasićenom vodom. Koncentracija osnovnog rastvora precizno se utvrđuje pre nego što se pristupi određivanju koeficijenta raspodele. Rastvor se čuva u uslovima koji omogućavaju da bude stabilan.

*1.6.2.2. Uslovi ispitivanja*

Temperatura ispitivanja treba da bude konstantna (± 1° C) u rasponu od 20° C do 25° C.

*1.6.2.3. Merenje*

1.6.2.3.1. Uspostavljanje ravnoteže raspodele

Po dve posude koje sadrže željene, precizno izmerene količine dva rastvarača zajedno sa neophodnom količinom osnovnog rastvora spremaju se za svaki uslov ispitivanja.

Faza *n*-oktanola meri se zapreminski. Posude za ispitivanje smeštaju se u prikladnu mućkalicu (šejker) ili se ručno izmućkaju. Kada se koriste kivete za centrifugiranje preporučeni način rukovanja jeste da se cev rotira brzo za 180° oko transverzalne ose tako da vazduh koji je ušao prođe kroz obe faze. Iskustvo je pokazalo da je 50 takvih rotacija dovoljno da se uspostavi ravnoteža raspodele. Preporučuje se 100 rotacija u roku od 5 minuta.

*1.6.2.4. Odvajanje faza*

Ako je neophodno, da bi se razdvojile faze, smeša se centrifugira. Dvofazni sistem se centrifugira na laboratorijskoj centrifugi, na sobnoj temperaturi ili, ako se koristi centrifuga bez regulacije temperature, kivete se drže na temperaturi koja odgovara onoj u kojoj se sprovodi čitavo ispitivanje najmanje 1 sat pre ispitivanja.

*1.6.2.5. Analiza*

Da bi se odredio particioni koeficijent neophodno je odrediti koncentracije ispitivane susptance u obe faze. Ovo se radi uzimanjem alikvota iz svake od dve faze iz svakog ispitivanja i analiziranjem ovih uzoraka. Ukupna količina supstance prisutna u obe faze izračunava se i upoređuje sa količinom supstance koja je uneta na početku testa.

Vodena faza se uzorkuje postupkom koji smanjuje rizik od uzorkovanja i tragova *n-*oktanola. Koristi se stakleni špric sa iglom za jednokratnu upotrebu za uzorkovanje vodene faze. Špric se prethodno delimično napuni vazduhom. Vazduh se polako istiskuje dok igla prolazi kroz sloj *n-*oktanola. Zatim se određena količina vodene faze usisa u špric. Špric se brzim pokretom izvuče iz rastvora, a igla odstrani. Sadržaj napunjenog šprica se tada koristi kao uzorak vodene faze. Koncentracija u dve različite faze utvrđuje se korišćenjem metoda koje su odgovarajuće za svaku od supstanci. Neke od odgovarajućih metoda su:

- fotometrijske metode;

- gasna hromatografija;

- HPLC metoda.

**1.6.3. HPLC metoda**

*1.6.3.1. Priprema*

Oprema

Tečni hromatograf sa pumpom bez pulsa i odgovarajući detektor čine neophodnu opremu. Preporučuje se korišćenje injektora sa petljom. Prisustvo polarnih grupa u stacionarnoj fazi može ozbiljno da naruši preciznost kolone za tečnu hromatografiju. U stacionarnoj fazi je prisutan minimalni procenat polarnih grupa**11**. Koriste se komercijalna mikročestična reversno-fazna pakovanja ili prethodno pripremljene kolone. Između injektora i kolone postavlja se predkolona.

Mobilna faza

Za pripremu eluenta koriste se metanol HPLC čistoće i voda HPLC čistoće koji se degaziraju pre upotrebe. Koristi se izokratska elucija. Preporučuje se odnos metanol/voda sa minimalnim sadržajem vode u iznosu od 25%. Tipična smeša metanola i vode u odnosu 3:1 (v/v) koristi se za eluiranje jedinjenja sa logP 6 u roku od jednog sata, sa protokom od 1 ml/min. Za jedinjenja sa visokim logP nekada je potrebno skratiti vreme eluiranja (kao i za referentne supstance) smanjivanjem polarnosti mobilne faze ili dužine kolone.

Supstance koje su slabo rastvorne u *n-*oktanolu imaju tendenciju da daju niske log Pow vrednosti pri određivanju HPLC metodom, pikovima takvih smeša je ponekad pridružen front rastvarača. Ovo se objašnjava činjenicom da je proces raspodele previše spor da bi se dostigla ravnoteža u vremenu koje je obično neophodno za HPLC razdvajanje. Smanjenje brzine protoka i/ili snižavanje odnosa metanol/voda mogu pomoći da se u tim slučajevima dobiju pouzdanije vrednosti.

Supstanca koja se ispituje i referentna supstanca treba da budu rastvorne u mobilnoj fazi u dovoljnoj koncentraciji da mogu da se detektuju. Izuzetno se mogu koristiti aditivi kod smeše metanol-voda, pošto aditivi menjaju svojstva kolone. Kod hromatograma koji sadrže aditive obavezno je koristiti zasebne kolone istog tipa. Ukoliko smeša metanol-voda nije odgovarajuća, koristi se neka druga smeša organskog rastvarača i vode, npr etanol i voda ili acetonitril i voda.

Vrednost pH eluenta je kritična kod jedinjenja koja jonizuju. Ova vrednost treba da se kreće u okviru radne pH vrednosti kolone, koja obično iznosi između 2 i 8. Preporučuje se primena pufera. Vodi se računa da ne dođe do precipitacije soli na koloni i njenog uništavanja, što se događa kod pojedinih smeša organska faza/pufer. HPLC merenja sa stacionarnom fazom koja je na bazi silicijum-dioksida na pH vrednostima iznad 8 ne preporučuju se pošto alkalne mobilne faze oštećuju kolonu i umanjuju performanse kolone.

Rastvorene supstance

Referentne supstance treba da budu što je moguće čistije. Jedinjenja koje se koriste u ispitivanju ili za kalibraciju treba da budu rastvorna u mobilnoj fazi, ako je moguće.

Uslovi ispitivanja

Temperatura tokom ispitivanja ne treba da varira za više od ± 2K.

*1.6.3.2. Merenje*

Izračunavanje mrtvog vremena to

Mrtvo vreme se određuje korišćenjem serije homologa (npr n-alkil metil ketoni) ili organskih jedinjenja koja se ne zadržavaju na koloni (npr. tiokarbamid ili formamid). Da bi se izračunalo mrtvo vreme uz pomoć homologih serija, set od najmanje sedam članova homologe serije se injektuje i mere se retenciona vremena. Retenciona vremena *t*r (nc + 1) ucrtavaju se na grafiku kao funkcija od *t*r (n c) i određuju se odsečak a i nagib b u jednačini:

*t*r (n c + 1) = *a + b t*r (n c)

pri čemu:

*n*c jeste broj atoma ugljenika.

Mrtvo vreme se izračunava jednačinom:

*t*o = a/(1 - b)

Kalibraciona kriva

Sledeći korak je da se napravi korelacija između log k vrednosti prema log P vrednostima za odgovarajuće referentne supstance. U praksi, set od između 5 i 10 standardnih referentnih supstanci čija logP vrednost je u očekivanom opsegu injektuje se simultano i određuju se njihova retenciona vremena, po mogućnosti preko integratora koji je povezan sa sistemom za detekciju. Odgovarajuće logaritamske vrednosti faktora kapaciteta (log k) računaju se i ucrtavaju kao funkcije log P koji je utvrđen primenom postupka mućkanja u staklenom balonu. Kalibracija se obavlja u pravilnim intervalima, najmanje jednom dnevno, tako se kompenzuju izmene u performansama kolona.

Utvrđivanje faktora kapaciteta ispitivane susptance

Supstanca koja se ispituje injektuje se u najmanjoj mogućoj količini mobilne faze. Određuje se retenciono vreme (po dva određivanja), što omogućava izračunavanje faktora kapaciteta (k). Sa kalibracione krive referentnih supstanci interpolira se koeficijent raspodele ispitivane supstance. Kod veoma niskih i veoma visokih vrednosti koeficijenata raspodele, neophodna je ekstrapolacija. Vodi se računa o granicama pouzdanosti regresione krive.

**2. PODACI**

Metoda mućkanja u staklenom balonu

Pouzdanost utvrđenih vrednosti za P ispituje se poređenjem srednjih vrednosti iz oba ispitivanja sa ukupnom srednjom vrednošću.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);

- kada se metode ne mogu primeniti (npr. površinski aktivne supstance), obezbeđuje se računskim putem izvedena ili procenjena vrednost na osnovu rastvorljivosti u *n-*oktanolu i vodi;

- sve podatke i primedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

Izveštaj o ispitivanju kod postupka mućkanja u staklenom balonu sadrži:

- rezultate preliminarnih ispitivanja, ako postoje;

- temperaturu na kojoj je vršeno određivanje;

- podatke o analitičkim postupcima kojima su određivane koncentracije;

- vreme i brzinu centrifugiranja, ako je vršeno;

- izmerene koncentracije u obe faze kod svakog određivanja (ukupno 12 koncentracija);

- masu ispitivane supstance, zapreminu svake faze u svakoj posudi i ukupne izračunate količine ispitivane supstance prisutne u svakoj fazi nakon uspostavljanja ravnoteže;

- izračunate vrednosti particionog koeficijenta (P) i srednje vrednosti za svaki set uslova ispitivanja kao i srednju vrednost za sva određivanja. Ukoliko se smatra da postoji zavisnost koeficijenta raspodele od koncentracije to se navodi u izveštaju;

- standardne devijacije individualnih P vrednosti od srednje vrednosti;

- srednju vrednost P od svih određivanja, izražava se u vidu logaritma (osnove 10);

- izračunatu teorijsku vrednost Pow ako je utvrđena ili kada je izmerena vrednost > 104;

- pH vrednost korišćene vode i vodene faze tokom eksperimenta;

- ukoliko se koriste puferi, navode se razlozi za njihovu primenu umesto vode, njihov sastav, koncentracija i pH vrednost, pH vodene faze pre i posle eksperimenta.

Izveštaj o ispitivanju za HPLC metodu sadrži:

- rezultate prethodnih ispitivanja, ako postoje;

- ispitivanu supstancu i referentne supstance, i stepen njihove čistoće;

- temperaturni opseg pri ispitivanju;

- pH vrednosti na kojoj je određivan koeficijent raspodele;

- detalje o analitičkoj koloni, predkoloni, mobilnoj fazi i načinima detekcije;

- podatke o retencionim vremenima i literaturnim vrednostima log P referentnih supstanci korišćenih za kalibraciju;

- detalje o regresionoj krivoj (log k prema log P);

- prosečna retenciona vremena i interpolirane vrednosti log P za ispitivano jedinjenje;

- opis opreme i uslova ispitivanja;

- elucioni profil;

- količine ispitivanih i referentnih supstanci koje su unete u kolonu;

- mrtvo vreme i način na koji je izmereno.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

3. Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) - Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4. L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh - Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

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

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

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

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

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

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

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

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

13. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14. NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use - Determination of Partition Coefficients - Flask shakin g method.

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

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

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

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

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

20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische St ruktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

21. R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

22. Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base 11978.

23. N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19,615.

**Deo drugi**

**METODE IZRAČUNAVANJA/PROCENE**

UVOD

Opšti uvod za metode izračunanja, podaci i primeri mogu se naći u literaturi**1**.

Izračunate vrednosti Pow mogu se koristiti u sledeće svrhe:

- da se izabere odgovarajuća eksperimentalna metoda (opseg za metodu mućkanja u staklenom balonu: log Pow: - 2 do 4, opseg za HPLC metodu: log Pow od 0 do 6);

- za izbor odgovarajućih uslova ispitivanja (npr. referentne supstance za HPLC postupak, odnos zapremina *n-*oktanol/voda kod postupka mućkanja u staklenom balonu);

- kao interna laboratorijska provera mogućih eksperimentalnih grešaka;

- da se obezbede procenjene vrednosti za Pow u slučajevima kada se ne mogu primeniti eksperimentalne metode iz tehničkih razloga.

METODA PROCENE

Preliminarna procena particionog koeficijenta

Vrednost particionog koeficijenta procenjuje se na osnovu rastvorljivosti ispitivane supstance u čistim rastvaračima:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| P procenjeno = | zasićenje cn oktanol |  |
| zasićenje c voda |  |

METODE IZRAČUNAVANJA

Princip metoda izračunavanja

Sve metode izračunavanja zasnivaju se na fragmentaciji molekula na odgovarajuće manje strukture za koje je poznat doprinos vrednosti Pow. Vrednost log Pow koja se odnosi na čitav molekul izračunava se potom kao zbir odgovarajućih vrednosti fragmenata plus zbir korekcija zbog intramolekulskih interakcija.

Postoje spiskovi konstanti fragmenata i korekcionih članova**2, 3, 4, 5**. Neke od ovih vrednosti redovno se ažuriraju**2**.

Kriterijumi kvaliteta

Pouzdanost metode izračunavanja opada sa povećanjem složenosti jedinjenja. Kod jednostavnih molekula sa malim molekulskim masama i jednom ili dve funkcionalne grupe, očekuje se odstupanje od 0,1 do 0,3 jedinica vrednosti log Pow između rezultata različitih metoda fragmentacije i izmerene vrednosti. U slučaju složenijih molekula granica greške je i veća. Granica greške zavisi od pouzdanosti i dostupnosti vrednosti konstanti koje se odnose na određene fragmente, kao i od sposobnosti da se prepoznaju intramolekulske interakcije (npr. vodonične veze) i od pravilne upotrebe korekcija (problem je manji ako se koristi kompjuterski softver CLOGP-3)**2**. Kod jedinjenja koja jonizuju važno je ispravno tumačenje naelektrisanja i stepena jonizacije.

Postupak izračunavanja

Hanšova π - metoda

Originalna konstanta π hidrofobnog supstituenta koju je uveo Fujira sa grupom autora**6** definiše se na sledeći način:

x = log Pow (PhX) − log Pow (PhH)

pri čemu:

Pow (PhX) jeste particioni koeficijent supstituisanog aromatičnog derivata;

Pow (PhH) jeste koeficijent nesupstituisanog jedinjenja.

Na primer: Cl = log Pow (C6H5Cl) − log Pow (C6H6) = 2,84 − 2,13 = 0,71.

U skladu sa definicijom ova metoda se pre svega primenjuje kod aromatičnih supstituenata.  vrednosti za veliki broj ovakvih supstituenata date su u tabeli**2, 3, 4**. Ove vrednosti se koriste za izračunavanje log Pow za aromatične molekule ili fragmenata.

Rekerova metoda

Prema Rekerug log Pow izračunava se na sledeći način:

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s027.gif

pri čemu:

fi jesu konstante različitih fragmenata molekula;

ai jeste učestalost različitih fragmenata molekula u molekulu koji se ispituje.

Korekcioni članovi mogu se izraziti kao proizvod integrala sa jednom konstantom Cm (tzv. magična konstanta). Vrednosti konstanti za fi i cm utvrđene su na osnovu podataka iz spiska u kome se nalazi 1054 eksperimentalno određenih vrednosti Pow (825 jedinjenja), primenom regresione analize**3, 8**. Određivanje interakcijskih termina sprovodi se na osnovu pravila datih u literaturi **5, 8, 9**.

*Hanš-Leov metod*

Prema Hanšu i Leu**3** vrednost log Pow izračunava se iz jednačine:

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s028.gif

pri čemu:

fi jesu konstantne različitih fragmenata molekula;

Fj jeste korektivna vrednost;

a ai i bj jeste odgovarajuća učestalost nalaženja u molekulu.

Izvedene na osnovu vrednosti Pow utvrđenih eksperimentalnim putem, vrednosti konstanti atoma i grupa u molekulu i korektivne vrednosti Fj (tzv. faktori) iz spiska određene su metodom pokušaja i grešaka. Korektivne vrednosti podeljene su u nekoliko različitih klasa**1, 3**. Relativno je komplikovano i oduzima dosta vremena da se vodi računa o svim pravilima i svim korektivnim vrednostima. U tu svrhu razvijeni su odgovarajući softveri**2**.

Kombinovana metoda

Izračunavanje log P vrednosti kod složenih molekulskih struktura se znatno poboljšava, ukoliko se molekul razdvoji u veće podstrukture za koje postoje pouzdane log P vrednosti, koje su dostupne u tabelama**2, 3** ili na osnovu sopstvenih merenja. Takvi fragmenti (npr. heterociklična jedinjenja, antrahinon, azobenzen) potom se mogu kombinovati sa Hanšovim *π* vrednostima ili Rekerovim ili Leovim konstantama.

Napomene:

1) Metoda izračunavanja se primenjuje na delimično ili potpuno jonizovana jedinjenja kada je moguće uzeti u obzir neophodne korektivne faktore.

2) Ukoliko se pretpostavlja postojanje vodoničnih veza, dodaju se odgovarajući korektivni faktori (oko + 0,6 do + 1,0 log Pow jedinica). Prisustvo takvih veza u molekulu se pretpostavlja na osnovu stereo modela ili na osnovu analize spektroskopskih podataka molekula.

3) Ukoliko je moguće više tautomernih oblika, koristi se najverovatniji oblik kao osnovu za proračune.

4) Pažljivo se prate revizije spiska sa konstantama fragmenata molekula.

Izveštaj

Kada se koristi metoda proračuna/procene izveštaj o izvršenom ispitivanju sadrži:

- opis supstance (smeša, nečistoće, itd.);

- indikacije o mogućim vodoničnim vezama, disocijaciji, naelektrisanju i svim drugim efektima (npr. tautomeriji);

- opis metode izračunavanja;

- identifikacija baze podataka;

- osobenosti pri izboru fragmenata;

- opsežna dokumentacija o proračunima.

Literatura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Deo treći**

**REFERENTNE SUPSTANCE ZA HPLC**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Br. | Referentna supstanca | log Pow | pKa |
| 1 | 2-butanon | 0,3 |  |
| 2 | 4-acetilpiridin | 0,5 |  |
| 3 | anilin | 0,9 |  |
| 4 | acetanilid | 1,0 |  |
| 5 | benzil alkohol | 1,1 |  |
| 6 | p-metoksifenol | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | fenoksisirćetna kiselina | 1,4 | pKa = 3,12 |
| 8 | fenol | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 2,4-dinitrofenol | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | benzonitril | 1,6 |  |
| 11 | fenilacetonitril | 1,6 |  |
| 12 | 4-metilbenzil alkohol | 1,6 |  |
| 13 | acetofenon | 1,7 |  |
| 14 | 2-nitrofenol | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | 3-nitrobenzoeva kiselina | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 4-hloranilin | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | nitrobenzen | 1,9 |  |
| 18 | cimet alkohol | 1,9 |  |
| 19 | benzoeva kiselina | 1,9 | pKa=4,19 |
| 20 | *p*-krezol | 1,9 | pKa=10,17 |
| 21 | cimetna kiselina | 2,1 | pKa=3,89 cis 4,44 trans |
| 22 | anizol | 2,1 |  |
| 23 | metil-benzoat | 2,1 |  |
| 24 | benzen | 2,1 |  |
| 25 | 3-metilbenzoeva kiselina | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 26 | 4-hlorfenol | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | trihloreten | 2,4 |  |
| 28 | atrazin | 2,6 |  |
| 29 | etilbenzoat | 2,6 |  |
| 30 | 2,6-dihlorbenzonitril | 2,6 |  |
| 31 | 3-hlorbenzoeva kiselina | 2,7 | pKa = 3,82 |
| 32 | toluen | 2,7 |  |
| 33 | 1-naftol | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 2,3-dihloranilin | 2,8 |  |
| 35 | hlorbenzen | 2,8 |  |
| 36 | alilfenil etar | 2,9 |  |
| 37 | brombenzen | 3,0 |  |
| 38 | etilbenzen | 3,2 |  |
| 39 | benzofenon | 3,2 |  |
| 40 | 4-fenilfenol | 3,2 | pKa=9,54 |
| 41 | timol | 3,3 |  |
| 42 | 1,4-dihlorbenzen | 3,4 |  |
| 43 | difenilamin | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | naftalen | 3,6 |  |
| 45 | fenil-benzoat | 3,6 |  |
| 46 | izopropilbenzen | 3,7 |  |
| 47 | 2,4,6-trihlorfenol | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | bifenil | 4,0 |  |
| 49 | benzil-benzoat | 4,0 |  |
| 50 | 2,4-dinitro-6 *sec*-butilfenol | 4,1 |  |
| 51 | 1,2,4-trihlorbenzen | 4,2 |  |
| 52 | dodekanska kiselina | 4,2 |  |
| 53 | difenil-etar | 4,2 |  |
| 54 | n-butilbenzen | 4,5 |  |
| 55 | fenantren | 4,5 |  |
| 56 | fluoranten | 4,7 |  |
| 57 | dibenzil | 4,8 |  |
| 58 | 2,6-difenilpiridin | 4,9 |  |
| 59 | trifenilamin | 5,7 |  |
| 60 | DDT | 6,2 |  |

**A.9. TAČKA PALJENJA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Pre izvođenja ispitivanja korisno je imati podatke o zapaljivosti supstance. Postupak ispitivanja primenjuje se na tečne supstance čije se pare mogu zapaliti izvorom paljenja. Date metode pouzdane su samo za opsege tačke paljenja koji su dati u pojedinačnim metodama.

Prilikom izbora metode koja će se primenjivati u postupku ispitivanja, uzima se u obzir mogućnost pojave hemijskih reakcija između supstance i posude za uzorak.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Tačka paljenja jeste najniža temperatura, korigovana na pritisak od 101,325 kPa, pri kojoj tečnost proizvodi paru u uslovima definisanim u ovoj metodi, u dovoljnoj količini za stvaranje zapaljive smeše pare i vazduha u tom sudu.

Merne jedinice: stepen Celzijusa (°C).

*t* = T - 273,15

pri čemu:

*t* jeste temperatura u stepenima Celzijusa (°C);

T jeste temperatura u stepenima kelvina (K).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Prilikom ispitivanja nove supstance nije potrebno u svim slučajevima koristiti referentne supstance. One pre svega služe za povremenu proveru metode, kao i da omoguće poređenje sa rezultatima ostalih metoda.

*1.4. PRINCIP METODE*

Supstanca se unosi u sud za ispitivanje i zagreva se ili se hladi do temperature ispitivanja u skladu sa postupkom opisanim u pojedinačnoj metodi ispitivanja. Ispitivanje paljenja vrši se radi utvrđivanja da li se uzorak pali na temperaturi ispitivanja.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.5.1. Ponovljivost**

Ponovljivost varira prema opsegu tačke paljenja i metode koja se koristi, maksimalno 2° C.

**1.5.2. Osetljivost**

Osetljivost zavisi od korišćene metode ispitivanja.

**1.5.3. Specifičnost**

Specifičnost nekih metoda ograničena je opsegom tačke paljenja i zavisi od svojstava supstance (npr. visoka viskoznost).

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Uzorak supstance za ispitivanje unosi se u aparaturu za ispitivanje u skladu sa odeljkom 1.6.3.1, odnosno sa odeljkom 1.6.3.2. ove metode.

Kada se ispituju energijom bogate ili toksične supstance, iz sigurnosnih razloga se preporučuje primena metode koja koristi manju količinu uzorka, oko 2 cm3.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

Uređaj se postavlja u položaj u kom nema spoljašnjih uticaja, vodeći računa o bezbednosti.

**1.6.3. Postupak ispitivanja**

*1.6.3.1. Metoda ravnoteže*

Videti standarde: SRPS EN ISO 1516, SRPS EN ISO 3680, SRPS EN ISO 1523, SRPS EN ISO 3679.

*1.6.3.2. Metoda neravnoteže*

Metoda po Abelu

Videti standard: SRPS EN ISO 13736.

Metoda po Abel-Penskom aparatura

Videti standard: SRPS B.H8.047.

Metoda po Tagu**XXIV**

Metoda po Penski-Martensu

Videti standard: SRPS EN ISO 2719.

Napomene:

Kada tačka paljenja, određena metodom neravnoteže iz odeljka 1.6.3.2. ove metode, iznosi 0° C ± 2° C, 21° C ± 2° C ili 55° C ± 2° C, tačku paljenja je potrebno potvrditi metodom ravnoteže uz upotrebu iste aparature.

Za davanje podataka koriste se isključivo metode koje daju temperaturu tačke paljenja.

Za određivanje tačke paljenja viskoznih tečnosti (boje, lepkovi i sl.) koje sadrže rastvarače, mogu se koristiti aparatura i metode koji su prikladni za određivanje tačke paljenja viskoznih tečnosti.

Videti standarde: SRPS EN ISO 3679, SRPS EN ISO 3680, SRPS EN ISO 1523.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXIV** ASTM D 56

**2. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- tačan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);

- podatke o korišćenoj metodi, kao i mogućim odstupanjima;

- rezultate i dodatne napomene značajne za tumačenje rezultata.

**A.10. ZAPALJIVOST (ZA ČVRSTE SUPSTANCE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Pre izvođenja ispitivanja korisno je imati podatke o mogućim eksplozivnim svojstvima supstance.

Ovo ispitivanje primenjuje se isključivo na praškaste supstance, supstance u obliku paste ili u granulama.

Kako bi se izbeglo da se u ovu kategoriju svrstaju sve zapaljive supstance, već samo one koje brzo gore ili supstance čije je ponašanje u toku gorenja na bilo koji način opasno, u kategoriju lako zapaljivih svrstavaju se samo supstance čija brzina sagorevanja prelazi utvrđene granične vrednosti.

Posebnu opasnost predstavlja širenje usijanja kroz metalni prah zbog poteškoća koje se mogu javiti pri gašenju požara. Metalni prah se smatra visoko zapaljivom supstancom ukoliko podržava širenje usijanja kroz masu u određenom vremenskom roku.

*1.2. MERNE JEDINICE*

Vreme sagorevanja izražava se u sekundama.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIPI METODE*

Supstanca se oblikuje u vidu neprekidne trake ili neprekidnog praškastog traga dužine 250 mm. Preliminarno ispitivanje vrši se sa ciljem da se utvrdi da li dolazi do širenja gorenja sa razvojem plamena ili do tinjanja kada se supstanca zapali plamenikom na gas. Ukoliko se vatra proširi u dužini od 200 mm u određenom vremenskom roku, sprovodi se kompletno ispitivanje kako bi se utvrdila brzina sagorevanja.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Preliminarno ispitivanje**

Supstanca se oblikuje u vidu neprekidne trake ili neprekidnog praškastog traga dužine 250 mm, širine 20 mm i visine 10 mm na nezapaljivoj, neporoznoj podlozi koja slabo provodi toplotu. Vreo plamen iz plamenika na gas (minimalni prečnik 5 mm) prinosi se jednom kraju praškastog traga supstance sve dok se prah ne zapali ili maksimalno 2 minuta (5 minuta za metalni prah ili legure metala). Prati se da li se gorenje širi kroz trag u dužini od 200 mm u roku od 4 minuta (ili 40 minuta za metalni prah). Ukoliko se u roku od 4 minuta (ili 40 minuta za metalni prah) supstanca ne zapali i gorenje se ne proširi uz razvijanje plamena ili tinjanje u dužini od 200 mm praškastog traga ispitivane supstance, supstanca se ne smatra lako zapaljivom i nije potrebno vršiti dalje ispitivanje. Ukoliko se za manje od 4 minuta, ili za manje od 40 minuta kada je reč o metalnom prahu, ispitivana supstanca zapali i požar se proširi po uzorku u dužini od 200 mm, primenjuje se postupak iz odeljka 1.6.2. ove metode i ostalih odeljaka.

**1.6.2. Određivanje brzine gorenja**

*1.6.2.1. Priprema*

Praškasta ili supstanca u granulama naspe se u kalup dužine 250 mm sa poprečnim presekom u obliku trougla unutrašnje visine 10 mm i širine 20 mm. Sa obe strane kalupa montiraju se dve metalne ploče kao stranični graničnici koji prelaze gornju ivicu kalupa za 2 mm (videti Sliku). Kalup se zatim tri puta ispusti sa visine od 2 cm na čvrstu podlogu. Ukoliko je potrebno kalup se ponovo napuni. Poprečni graničnici se zatim skinu, a višak supstance očisti. Preko kalupa se stavlja ploča od nezapaljivog, neporoznog materijala koji slabo provodi toplotu, cela aparatura se okrene naopako, a zatim se ukloni kalup.

Supstance u obliku paste razmažu se po podlozi koja je napravljena od nezapaljivog, neporoznog materijala koji slabo provodi toplotu u obliku užeta dužine 250 mm sa poprečnim presekom oko 1 cm2.

*1.6.2.2. Uslovi ispitivanja*

U slučaju supstanci koje su osetljive na vlagu ispitivanje se izvodi što je brže moguće nakon što se supstanca izvadi iz posude.

*1.6.2.3. Postupak ispitivanja*

Formira se uzorak i postavlja u digestor.

Brzina protoka vazduha treba da bude dovoljna da spreči širenje dima laboratorijom i da se ne menja tokom ispitivanja. Oko aparature se podigne zaklon. Vreo plamen iz plamenika na gas (minimalni prečnik 5 mm) koristi se da se zapali supstanca na jednom kraju. Kada se supstanca upali sa razdaljine od 80 mm, na narednih 100 mm meri se brzina gorenja. Ispitivanje se ponavlja šest puta, i svaki put se koristi čista hladna ploča, osim ukoliko se ranije dobiju pozitivni rezultati.

**2. PODACI**

Za procenu su značajni podaci o: vremenu sagorevanja dobijenom na preliminarnom ispitivanju (odeljak 1.6.1. ove metode) i najkraćem vremenu sagorevanja od najviše šest ispitivanja (odeljak 1.6.2.3. ove metode).

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži:

- precizan opis supstance (identifikacija i nečistoće);

- opis supstance koja se ispituje, njeno fizičko stanje uključujući sadržaj vlage;

- rezultate preliminarnog ispitivanja i ispitivanja za utvrđivanje brzine sagorevanja, ukoliko je izvršeno;

- sve dodatne podatke značajne za tumačenje rezultata.

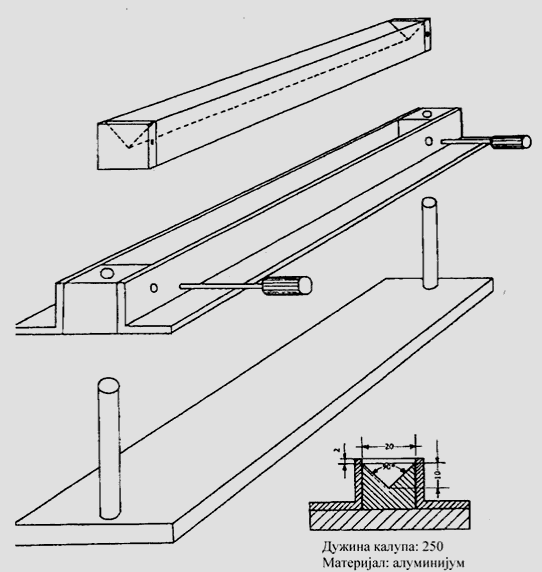
*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Praškaste supstance i supstance u obliku grnula ili paste smatraju se lako zapaljivima kada je vreme sagorevanja na bilo kom od sprovedenih ispitivanja opisanih u odeljku 1.6.2. ove metode manje od 45 sekundi. Metalni prah ili legure metala smatraju se lako zapaljivim supstancama kada se mogu zapaliti ili se zona reakcije proširi na ceo uzorak u roku od 10 minuta ili manje.

**4. LITERATURA**

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

Slika: Kalup i pribor za pripremu uzorka za ispitivanje (Sve dimenzije izražene su u milimetrima)



**A.11. ZAPALJIVOST (ZA GASOVE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ovom metodom utvrđuje se da li su gasovi zapaljivi u smeši sa vazduhom na sobnoj temperaturi (oko 20° C) i atmosferskom pritisku, i ako jesu, u kojim opsezima koncentracija. Smeše ispitivanog gasa (u rastućim koncentracijama) i vazduha izlažu se dejstvu električne varnice i posmatra se da li dolazi do paljenja.

*1.2. DEFINICIJE*

Opseg zapaljivosti jeste opseg koncentracija između donje i gornje granice eksplozivnosti. Donja i gornja granica eksplozivnosti jesu one granične koncentracije zapaljivih gasova u smeši sa vazduhom kod kojih ne dolazi do pojave plamena.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Koncentracija gasa u vazduhu povećava se postepeno i smeša se svaki put izlaže električnoj varnici.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Aparatura**

Posuda za ispitivanje jeste uspravni stakleni cilindar minimalnog unutrašnjeg prečnika 50 mm i minimalne visine 300 mm. Elektrode za paljenje postavljaju se na rastojanju od 3 mm do 5 mm i 60 mm iznad dna cilindra. Cilindar ima otvor za odušak. Aparatura se zaštićuje da bi se sprečila eventualna oštećenja usled eksplozije.

Kao izvor paljenja koristi se standardna indukciona varnica trajanja 0,5 sekundi, koju proizvodi visokonaponski transformator izlaznog napona od 10 kV do 15 kV (maksimalne snage 300 W). Primer odgovarajuće aparature dat je u literaturi**2**.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

**1.6.3. Postupak ispitivanja**

U stakleni cilindar se pomoću pumpi uvodi poznata koncentracija gasa u vazduhu. Varnica se propušta kroz smešu i posmatra se da li se plamen odvaja od izvora paljenja i da li se razvija samostalno. Koncentracija gasa se menja u koracima od 1% zapreminski sve dok ne dođe do paljenja.

Ako hemijska struktura gasa ukazuje da je on nezapaljiv i ako se izračuna sastav stehiometrijske smeše sa vazduhom, onda se samo smeše u opsegu 10% manje od stehiometrijskog sastava do 10% više od ovog sastava ispituju u koracima od 1% zapreminski.

**2. PODACI**

Jedini značajan podatak za određivanje ovog svojstva je pojava i razvoj plamena.

**3. IZVEŠTAVANJE**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- precizan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);

- opis korišćene aparature sa njenim dimenzijama;

- temperaturu na kojoj je supstanca ispitivana;

- ispitane koncentracije i dobijene rezultate;

- rezultat ispitivanja: nezapaljivi gas ili lako zapaljivi gas;

- ukoliko je zaključeno da je gas nezapaljiv, unose se podaci o opsegu koncentracija koji je ispitan u koracima od 1% zapreminski;

- sve podatke i napomene značajne za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

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

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann "Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen". Chem.-Ing.-Tech. 1984, vo1. 56, 2, 126-127., T. Redeker und H. Schacke, p. 126-127.

**A.12. ZAPALJIVOST (U KONTAKTU SA VODOM)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ovom metodom ispitivanja utvrđuje se da li se u reakciji supstance sa vodom ili vlažnim vazduhom razvijaju opasne količine gasa ili gasova koji mogu biti veoma zapaljivi.

Metoda se primenjuje i na čvrste i na tečne supstance, a ne primenjuje se na supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom.

*1.2. DEFINICIJE*

Veoma zapaljiva supstanca jeste supstanca koja u kontaktu sa vodom ili vlažnim vazduhom razvija veoma zapaljive gasove u opasnim količinama, minimalnom brzinom od 1 L/kg po satu.

*1.3. PRINCIPI METODE*

Supstanca se ispituje postupno (korak po korak) kako je opisano u ovom odeljku. Ukoliko se u bilo kom koraku razvije plamen, ispitivanje se ne nastavlja. Ukoliko je poznato da supstanca ne razvija burnu reakciju sa vodom, nastavlja se sa sprovođenjem ispitivanja do koraka 4 (videti odeljak 1.3.4. ove metode).

**1.3.1. Korak 1**

Supstanca koja se ispituje stavlja se u posudu sa destilovanom vodom temperature 20° C i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju.

**1.3.2. Korak 2**

Ispitivana supstanca stavlja se na filter papir koji pluta po površini posude sa destilovanom vodom temperature 20° C i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju.

Filter papir se stavlja da bi zadržao supstancu na jednom mestu čime se povećava mogućnost da se ona zapali.

**1.3.3. Korak 3**

Ispitivana supstanca formira se u obliku gomile visine oko 2 cm i prečnika oko 3 cm. Na tako napravljenu gomilu doda se nekoliko kapi vode i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju.

**1.3.4. Korak 4**

Supstanca koja se ispituje meša se sa destilovanom vodom temperature od 20° C i meri se brzina razvijanja gasova u periodu od sedam sati, u intervalima od jednog sata. Ukoliko je brzina razvijanja gasova promenljiva, ili ukoliko se stalno povećava, nakon sedam sati merenja, vreme posmatranja se produžava maksimalno do pet dana. Ispitivanje se može prekinuti kada brzina razvijanja gasova pređe 1 L/kg na sat.

*1.4. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Korak 1**

*1.6.1.1. Uslovi ispitivanja*

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

*1.6.1.2. Postupak ispitivanja*

Malu količinu supstance koja se ispituje (oko 2 mm u prečniku) staviti u posudu sa destilovanom vodom. Prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance jer se ona smatra opasnom.

**1.6.2. Korak 2**

*1.6.2.1. Aparatura*

Filter papir koji pluta po površini destilovane vode u odgovarajućem sudu, npr. šolji za uparavanje prečnika 100 mm.

*1.6.2.2. Uslovi ispitivanja*

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

*1.6.2.3. Postupak ispitivanja*

Malu količinu supstance koja se ispituje (oko 2 mm u prečniku) staviti na centar filter papira. Prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance jer se ona smatra opasnom.

**1.6.3. Korak 3**

*1.6.3.1. Uslovi ispitivanja*

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

*1.6.3.2. Postupak ispitivanja*

Supstanca koja se ispituje formira se u obliku gomile visine oko 2 cm i prečnika oko 3 cm sa ulegnućem na vrhu. Nekoliko kapi vode ubaci su u šupljinu formiranu na vrhu gomile i prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance jer se ona smatra opasnom.

**1.6.4. Korak 4**

*1.6.4.1. Aparatura*

Aparatura se postavlja kao što je prikazano na Slici.

*1.6.4.2. Uslovi ispitivanja*

Pregledati posudu u kojoj se nalazi supstanca koja će se ispitivati i utvrditi da li sadrži materije u prahu veličine čestica < 500 μm. Ukoliko praškaste materije čine više od 1% masenog od ukupne količine supstance ili ukoliko je uzorak trošan, pre ispitivanja čitava supstanca se spraši kako bi se prilikom pakovanja i rukovanja omogućilo smanjenje veličine čestica supstance. U suprotnom, supstanca se ispituje u obliku u kome je dobijena. Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20° C) i pri atmosferskom pritisku.

*1.6.4.3. Postupak ispitivanja*

U kapalicu se sipa 10 ml do 20 ml vode, a 10 g supstance stavi se u erlenmajer. Zapremina gasova koji se pri tom izdvajaju meri se na bilo koji odgovarajući način. Slavina na kapalici otvori se tako da voda kaplje u erlenmajer i uključi se štoperica. Izdvajanje gasova proverava se na svakih sat vremena tokom perioda od sedam sati. Ukoliko je brzina izdvajanja gasova promenljiva, ili ukoliko se stalno povećava, nakon sedam sati merenja, merenje se produžava najviše do pet dana. Ispitivanje se može prekinuti u bilo kom trenutku merenja ako brzina razvijanja gasova pređe 1 L/kg na sat. Ovo ispitivanje vrši se tri puta.

Analizira se hemijski sastav gasa ukoliko je nepoznat. Kada gas sadrži veoma zapaljive sastojke, a nije poznato da li je čitava smeša veoma zapaljiva, pravi se smeša istog sastava i ispituje se u skladu sa metodom A.11. koja je data u ovom prilogu.

**2. PODACI**

Supstanca se smatra opasnom ukoliko:

- dolazi do spontanog paljenja u bilo kom koraku postupka ispitivanja;

- dolazi do izdvajanja zapaljivog gasa brzinom većom od 1 L/kg supstance na sat.

**3. IZVEŠTAVANJE**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- precizan opis supstance (identifikacija i sadržaj nečistoća);

- detalje o prethodnim pripremama supstance;

- rezultate ispitivanja (koraci 1, 2, 3 i 4 dati u odeljku 1.6. ove metode);

- hemijski sastav izdvojenog gasa;

- brzinu izdvajanja gasa ukoliko je primenjen korak 4 (dat u odeljku 1.6.4. ove metode);

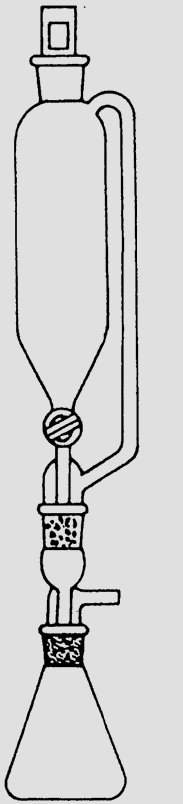
- dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

Slika: Aparatura



**A.13. SAMOZAPALJIVOST**

**(ZA ČVRSTE I TEČNE SUPSTANCE I SMEŠE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ispitivanje se primenjuje na čvrste i tečne supstance koje se, u malim količinama, spontano pale ubrzo posle kontakta sa vazduhom na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

Ovom metodom se ne ispituju supstance koje se, pre nego što se zapale, izlažu vazduhu satima ili danima na sobnoj ili povišenoj temperaturi.

*1.2. DEFINICIJE*

Smatra se da su supstance samozapaljive ukoliko se pale ili izazivaju ugljenisanje pri uslovima iz odeljka 1.6. ove metode.

Može se ukazati potreba za ispitivanjem samozapaljivosti tečnosti prema metodi A.15. Temperatura samozapaljenja (za tečnosti i gasove) datoj u ovom prilogu.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Supstanca se, bilo da je u čvrstom ili tečnom stanju, dodaje na inertni nosač i dovodi u kontakt sa vazduhom na sobnoj temperaturi u periodu od pet minuta. Ukoliko se tečna supstanca ne zapali, apsorbuje se u filter papir i izloži vazduhu na sobnoj temperaturi (oko 20° C) u periodu od pet minuta. Ako se čvrsta ili tečna supstanca zapale, ili ako tečna supstanca zapali ili ugljeniše filter papir, supstanca se smatra samozapaljivom.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost: zbog značaja za bezbednost jedan pozitivan rezultat je dovoljan da bi se supstanca smatrala samozapaljivom.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Aparatura**

Porcelanska šolja prečnika oko 10 cm puni se dijatomejskom zemljom do visine od oko 5 mm na sobnoj temperaturi (oko 20° C).

Napomena: Dijatomejska zemlja ili bilo koja druga slična inertna supstanca koja je uobičajeno dostupna uzima se kao reprezentativni uzorak zemljišta na koji se ispitivana supstanca sipa u slučaju akcidenta (nezgode).

Za ispitivanje tečnosti koristi se suvi filter papir koji se ne pali u kontaktu sa vazduhom kada dođe u dodir sa inertnim nosačem.

**1.6.2. Postupak ispitivanja**

a) Praškaste čvrste supstance i smeše

Sipa se 1 cm3 do 2 cm3 supstance koja se ispituje sa oko 1 cm visine na nezapaljivu površinu. Zatim se posmatra da li se supstanca pali tokom kapanja ili u roku od pet minuta stajanja. Ispitivanje se ponavlja šest puta, osim ako ne dođe do paljenja.

b) Tečnosti

Sipa se oko 5 cm3 tečnosti koja se ispituje u za to pripremljenu porculansku šolju. Zatim se posmatra da li se supstanca zapali u roku od pet minuta.

Ukoliko u šest ispitivanja ne dođe do paljenja, vrši se sledeće ispitivanje: špricem se nanese 0,5 ml uzorka za ispitivanje na udubljeni filter papir. Zatim se posmatra da li dolazi do paljenja ili ugljenisanja filter papira u roku od pet minuta od nanošenja tečnosti. Ispitivanje se ponavlja tri puta, osim ako ne dođe do paljenja ili ugljenisanja.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Ispitivanje se može prekinuti kad se uoče pozitivni rezultati kod bilo kog ispitivanja.

*2.2. PROCENA*

Smatra se da je supstanca samozapaljiva ako se zapali u roku od pet minuta po dodavanju te supstance na nosač i nakon izlaganja vazduhu, ili ako tečnost ugljeniše ili zapali filter papir u roku od pet minuta od nanošenja na papir i izlaganja vazduhu.

**3. IZVEŠTAVANJE**

Izveštaj, ukoliko je moguće, sadrži:

- precizan opis supstance (identifikaciju i sadržaj nečistoća);

- rezultate ispitivanja;

- sve dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. NF T 20-039 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

**A.14. EKSPLOZIVNOST**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ova metoda opisuje postupak ispitivanja kojim se utvrđuje da li čvrsta supstanca ili supstanca u obliku paste predstavljaju potencijalno opasne supstance koje mogu lako da eksplodiraju kada se izlože plamenu (termička osetljivost), udaru ili trenju (osetljivost na mehanički stimulus), i da li tečna supstanca razvija eksplozivno dejstvo kada se izloži dejstvu plamena ili udaru.

Metoda se sastoji iz tri dela:

1. ispitivanje termičke osetljivosti**1**;

2. ispitivanje mehaničke osetljivosti u odnosu na udar**1**;

3. ispitivanje mehaničke osetljivosti u odnosu na trenje**1**.

Ovom metodom dobijaju se podaci za procenu verovatnoće izazivanja eksplozije supstance primenom uobičajenih stimulusa. Metoda nije namenjena za utvrđivanje da li supstanca može da eksplodira pod bilo kojim uslovima.

Primenom ove metode utvrđuje se da li supstanca ima eksplozivna svojstva (termička i mehanička osetljivost) pod određenim uslovima. Zasniva se na primeni više tipova aparatura za ispitivanje koje se najčešće koriste u svetu**1** i koje daju dobre rezultate. Ova metoda nije definitivna. Mogu se koristiti i alternativne aparature ako su prihvaćene na međunarodnom nivou i da se rezultati takvih ispitivanja mogu dovesti u vezu i porediti sa rezultatima dobijenim primenom propisane aparature.

Ispitivanje se ne sprovodi kada dostupni podaci o termodinamičkim svojstvima (npr. toplota nastajanja, toplota razlaganja supstance) i/ili odsustvo određenih reaktivnih grupa**2** u strukturnoj formuli omogućavaju da se dovoljno pouzdano utvrdi da supstanca nema svojstva koja dovode do njenog brzog razlaganja uz izdvajanje gasova i oslobađanje toplote (tj. materijal ne predstavlja rizik od eksplozije). Kod tečnih supstanci se ne sprovodi ispitivanje mehaničke osetljivosti u odnosu na trenje.

*1.2. DEFINICIJE*

Eksplozivi jesu supstance koje mogu da eksplodiraju pod dejstvom plamena ili supstance koje su osetljive na udar ili trenje pri primeni propisane aparature za ispitivanje (ili su osetljivije na mehaničke udare od 1,3-dinitrobenzena ako se primenjuju alternativne aparature za ispitivanje).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

1,3-dinitrobenzen, tehnički kristalan proizvod prosejan kroz sito dimenzija 0,5 mm za potrebe ispitivanja reakcije na udar ili trenje.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, heksogen, ciklonit- CAS 121-82-4) prekristalisan iz vodenog rastvora cikloheksanona, koji je potom prosejan na vlažnom putu kroz sito veličine 250 μm i zadržan na situ veličine 150 μm, a potom osušen na temperaturi od 103° C ± 2° C (tokom 4 sata) radi sprovođenja druge serije ispitivanja osetljivosti na trenje i udar.

*1.4. PRINCIP METODE*

Preliminarna ispitivanja neophodna su da bi se utvrdili bezbednosni uslovi za izvođenje tri ispitivanja osetljivosti.

**1.4.1. Ispitivanje bezbednosti pri rukovanju supstancom3**

Iz bezbednosnih razloga, pre nego što se pristupi izvođenju osnovnog ispitivanja, male količine uzorka (oko 10 mg) ispitivane supstance zagrevaju se na otvorenom, gasnim plamenikom, izlažu se udarcu - uz primenu odgovarajuće aparature i trenju - uz upotrebu čekića i nakovnja ili drugog uređaja za ispitivanje trenja. Cilj ovog ispitivanja jeste da se utvrdi da li je supstanca toliko osetljiva i eksplozivna da se opisana ispitivanja, a pre svega ispitivanja njene termičke osetljivosti, sprovode uz posebne mere bezbednosti kako lice koje sprovodi ispitivanja ne bi bilo povređeno.

**1.4.2. Termička osetljivost**

Ova metoda podrazumeva zagrevanje supstance u čeličnoj cevi, zatvorenoj pomoću prigušnica sa različitim prečnikom otvora, kako bi se utvrdilo da li supstanca eksplodira pri intenzivnom zagrevanju u zatvorenoj sredini.

**1.4.3. Mehanička osetljivost (udar)**

Ovom metodom supstanca se izlaže udaru koji izaziva određena masa koja se ispusti na supstancu sa određene visine.

**1.4.4. Mehanička osetljivost (trenje)**

Ovom metodom čvrsta supstanca ili supstanca u obliku paste izlaže se trenju između standardnih površina pod određenim uslovima opterećenja i relativnog kretanja.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Termička osetljivost (uticaj plamena)**

*1.6.1.1. Aparatura*

Aparatura se sastoji od čelične cevi za jednokratnu upotrebu i višenamenskih zapušača (Slika 1), koji se postavljaju u sigurnosni uređaj za zagrevanje. Svaka cev izrađuje se oblikovanjem pod presom od čeličnog lima (videti Deo drugi ove metode) i ima unutrašnji prečnik 24 mm, dužinu 75 mm i debljinu zidova 0,5 mm. Cevi se na otvorenom kraju obrađuju tako da se mogu zatvoriti prigušnicom. Prigušnica je otporna na pritisak, ima centralni otvor, i pričvršćuje se za cev dvodelnim vijkom (sa navojem i maticom). Navoji vijka su izrađeni od visoko legiranog čelika sa hromom i manganom (videti Deo drugi ove metode) koji je otporan na visoke temperature koje mogu ići i do 800° C. Prigušnice su debljine 6 mm, načinjene od čelika otpornog na toplotu (videti Deo drugi ove metode), različitih veličina otvora.

*1.6.1.2. Uslovi ispitivanja*

Supstanca se ispituje u stanju u kome je dobijena. Izuzetno, npr. ukoliko je supstanca presovana, izlivena ili na drugi način komprimovana, može se najpre zdrobiti a potom ispitati.

Kod supstanci u čvrstom stanju, masa materijala koji se ispituje određuje se suvim postupkom u dve faze. Tarirana cev napuni se sa 9 cm3 supstance i sabije uz primenu sile od 80 N na poprečni presek cevi. Iz bezbednosnih razloga ili u slučajevima kada fizički oblik uzorka može biti izmenjen zbog kompresije koristi se neki drugi način punjenja, npr. ako je supstanca veoma osetljiva na trenje onda se ne primenjuje metod sabijanja. Ukoliko je materijal kompresibilan dodaje se još materijala sve dok se ne dođe do granice od 55 mm ispod vrha cevi. Zatim se odredi ukupna masa supstance koja je potrebna da se dođe do ove granice od 55 mm ispod vrha cevi i dodaju se još dve količine, pri čemu se svaki put za sabijanje koristi sila od 80 N. Zatim se ili doda još materijala ili se on odvadi tako da ostane količina u visini od 15 mm u odnosu na vrh cevi. Izvrši se druga provera na suvo uz upotrebu količine koja odgovara trećini sabijene mase korišćene kod prve suve probe. Još dva puta se dodaje supstanca i to ona koja je prethodno odvađena. Svaki put za sabijanje koristi se sila od 80 N, sve dok nivo supstance ne dođe do visine od 15 mm ispod vrha cevi. Količina čvrste supstance izmerena prilikom druge suve probe koristi se pri svakom daljem ispitivanju. Punjenje se vrši u tri jednake količine, od kojih se svaka kompresuje do 9 cm3 uz upotrebu odgovarajuće sile. (Postupak se olakšava upotrebom prstena za pravljenje proreda.)

Tečnosti i gelovi sipaju se u cev do visine od 60 mm, vodeći računa da se kod gelova ne stvaraju šupljine. Navojna obujmica se navuče na cev odozdo i ubacuje se odgovarajuća prigušnica. Navoj se zateže nakon što se nanese određena količina lubrikanta na bazi molibden-disulfida. Važno je proveriti da nema supstance između prirubnice i ploče ili na navojima.

Zagrevanje se vrši propanom iz industrijskih boca koje imaju regulator pritiska (60 mbar do 70 mbar) koji omogućava njegovu ravnomernu distribuciju (na šta upućuje vizuelna provera plamena u gorionicima) cevovodima do četiri gorionika. Gorionici se raspoređuju oko komore za ispitivanje kao što je prikazano na Slici 1. Četiri gorionika imaju kombinovanu potrošnju od oko 3,2 L propana u minuti.

Koriste se i druga gasovita goriva i drugačiji gorionici, ali brzina zagrevanja treba da bude u skladu sa brzinom datom na Slici 3. Kod svih tipova aparatura povremeno se vrši provera brzine zagrevanja uz pomoć cevi koje su napunjene dibutil-ftalatom kao što je prikazano na Slici 3.

*1.6.1.3. Postupak ispitivanja*

Ispitivanja se izvode ili dok se cev ne raspadne ili tako što se cev zagreva pet minuta. Kada se pri ispitivanju cev raspadne na tri ili više delova, koji mogu biti međusobno spojeni uskim trakama metala kao što je prikazano na Slici 2, smatra se da je došlo do eksplozije. Ako se prilikom ispitivanja cev raspala na manji broj delova ili se nije raspala, smatra se da nije došlo do eksplozije.

Prvo se sprovodi serija od tri ispitivanja sa prečnikom otvora prigušnice od 6,0 mm. Ukoliko ne dođe do eksplozije, vrši se druga serija od tri ispitivanja sa prečnikom otvora prigušnice od 2,0 mm. Ukoliko pri bilo kojoj od ovih serija ispitivanja dođe do eksplozije ne vrše se dalja ispitivanja.

*1.6.1.4. Procena*

Smatra se da je ispitivanje dalo pozitivne rezultate kada pri bilo kojoj od navedenih serija ispitivanja dođe do eksplozije.

**1.6.2. Mehanička osetljivost (udar)**

*1.6.2.1. Aparatura (Slika 4)*

Osnovni delovi tipične aparature sa padajućim čekićem su: klada od livenog čelika sa postoljem, nakovanj, kolona, vođice, tegovi, sprava za otpuštanje i držač uzorka. Čelični nakovanj dimenzija: 100 mm (prečnik) x 70 mm (visina) zašrafi se na gornju površinu čeličnog bloka dimenzija: 230 mm (dužina) x 250 mm (širina) x 200 mm (visina) sa livenim postoljem dimenzija: 450 mm (dužina) x 450 mm (širina) x 60 mm (visina). Kolona, sačinjena od bešavne čelične cevi, pričvršćuje se za nosač koji je zašrafljen za zadnji deo čeličnog bloka. Četiri šrafa pričvršćuju opremu za čvrst betonski blok 60 cm x 60 cm x 60 cm tako da su šine vođica u vertikalnom položaju i da tegovi padaju slobodno. Mogu se koristiti tegovi od 5 kg i 10 kg, napravljeni od čvrstog čelika. Udarni deo tega napravljen je od ojačanog čelika, HRC 60 do 63 i ima minimalni prečnik 25 mm.

Uzorak koji se ispituje zatvara se u uređaj za ispitivanje osetljivosti na udar koji se sastoji od dva koaksijalna cilindra napravljena od čvrstog čelika. Cilindri su postavljeni jedan iznad drugog i smeštaju se u šupalj cilindrični prsten od čelika. Cilindri od čvrstog čelika treba da budu prečnika 10 mm (- 0,003 mm, - 0,005 mm) i visine 10 mm, ispolirane površine, zaobljenih ivica (radijus zakrivljenosti 0,5 mm) i tvrdoće HRC 58 do 65. Šuplji cilindar ima spoljni prečnik 16 mm, ispoliranu unutrašnjost prečnika 10 mm (+ 0,005 mm, + 0,010 mm) i visine 13 mm. Uređaj za ispitivanje osetljivosti na udar postavlja se na nakovanj (prečnika 26 mm i visine 26 mm) koji je napravljen od čelika i centrira se pomoću prstena sa perforacijama koje omogućavaju ispuštanje para.

*1.6.2.2. Uslovi ispitivanja*

Zapremina uzorka je 40 mm3 ili odgovara alternativnoj opremi koja se koristi. Čvrste supstance ispituju se u suvom stanju i pripremaju na sledeći način:

1) praškaste supstance seju se kroz sito (veličina sita 0,5 mm); sve što prođe kroz sito koristi se za ispitivanje;

2) presovane, izlivene ili na drugi način komprimovane supstance sitne se u sitnije komade koji se proseju. Prosejani komadi prečnika između 0,5 mm i 1 mm koriste se pri ispitivanju i smatraju se uzorcima originalne supstance.

Supstance koje se isporučuju u obliku paste ispituju se u suvom stanju kad god je moguće, ili nakon uklanjanja što je moguće veće količine razređivača. Supstance koje se nalaze u tečnom stanju ispituju se tako što se ostavi razmak od 1 mm između gornjeg i donjeg cilindra.

*1.6.2.3. Postupak ispitivanja*

Vrši se serija od 6 ispitivanja uz bacanje tega mase od 10 kg sa visine od 0,40 m (40 J). Ukoliko pri seriji ispitivanja od 40 J dođe do eksplozije, sprovodi se još jedna serija od 6 ispitivanja u kojoj se koriste tegovi mase od 5 kg koji se bacaju sa visine od 0,15 m (7,5 J). Kod drugačije aparature uzorak se poredi sa odabranom referentnom supstancom po ustanovljenoj proceduri (npr. gore-dole tehnika, itd).

*1.6.2.4. Procena*

Rezultati ispitivanja smatraju se pozitivnim kada dođe do eksplozije (eksplozija sa vatrom i/ili stanje ekvivalentno eksploziji) najmanje kod jednog ispitivanja sa opisanim uređajem za ispitivanje osetljivosti na udar ili ako je uzorak osetljiviji od 1,3-dinitrobenzola ili RDX kod alternativnog ispitivanja osetljivosti na udar.

**1.6.3. Mehanička osetljivost (trenje)**

*1.6.3.1. Aparatura (Slika 5)*

Aparatura za ispitivanje osetljivosti na trenje sastoji se od osnovne ploče od livenog čelika na koju se postavlja aparatura za ispitivanje osetljivosti na trenje. Aparatura se sastoji od fiksiranog porcelanskog klina i pokretne porcelanske ploče. Porcelanska ploča se nalazi na klizaču koji se pokreće pomoću dve vođice. Klizač je povezan sa elektromotorom pomoću spojnice, ekscentra i odgovarajućeg prenosnog mehanizma koji omogućava da se porcelanska ploča pokrene, samo jedanput: napred i nazad ispod porcelanskog klina u dužini od 10 mm. Porcelanski klin izdržava opterećenje od, na primer, 120 N do 360 N.

Ravne porcelanske ploče izrađuju se od belog tehničkog porcelana (hrapavost 9 μm do 32 μm) i imaju dimenzije: 25 mm (dužina) x 25 mm (širina) x 5 mm (visina). Cilindrični porcelanski klin takođe se izrađuje od belog tehničkog porcelana i ima dužinu 15 mm, prečnik 10 mm i neravne sferne krajeve sa poluprečnikom zakrivljenosti od 10 mm.

*1.6.3.2. Uslovi ispitivanja*

Zapremina uzorka je 10 mm3 ili odgovara alternativnoj aparaturi koja se koristi. Čvrste supstance ispituju se u suvom stanju i pripremaju na sledeći način:

1) praškaste supstance seju se kroz sito (veličina sita 0,5 mm); sve što prođe kroz sito koristi se za ispitivanje;

2) presovane, izlivene ili na drugi način komprimovane supstance usitne se na sitnije komade koji se proseju. Prosejani komadi prečnika < 0,5 mm koriste se pri ispitivanju.

Supstance koje se isporučuju u obliku paste ispituju se u suvom stanju kad god je moguće. Ukoliko se supstanca ne može dovesti u suvo stanje, pasta (nakon uklanjanja što veće količine rastvarača) se ispituje u filmu debljine 0,5 mm, širine 2 mm i dužine 10 mm. Film se pravi pomoću šablona.

*1.6.3.3. Postupak ispitivanja*

Porcelanski klin dovede se u poziciju iznad uzorka i optereti se. Kada se sprovodi ispitivanje, markeri naneti sunđerom na porcelanskoj osnovi treba da stoje u transverzalnom položaju u odnosu na pravac kretanja.

Vodi se računa da klin bude na uzorku, da se dovoljna količina ispitivanog materijala nalazi ispod klina i da se podloga pravilno pokreće ispod klina. Kod supstanci u vidu paste koristi se šablon debljine 0,5 mm sa otvorom dimenzija 2 mm x 10 mm da bi se supstanca nanela na podlogu. Porcelanska podloga se kreće 10 mm napred-nazad ispod porcelanskog klina u vremenu od 0,44 sekunde. Svaki deo površine podloge i klina koristi se samo jednom. Dva kraja klina koriste se u dva ispitivanja, a dve površine podloge koriste se za ukupno tri ispitivanja.

Serija od šest ispitivanja vrši se sa opterećenjem od 360 N. Ukoliko se tokom ispitivanja dobiju pozitivni rezultati sprovodi se još jedna serija od 6 ispitivanja sa opterećenjem od 120 N. Kada se koriste drugi tipovi aparatura, uzorak se poredi sa izabranom referentnom supstancom uz primenu utvrđene procedure (npr. gore-dole tehnika i sl).

*1.6.3.4. Procena*

Rezultati ispitivanja smatraju se pozitivnim ukoliko dođe do eksplozije (praska i/ili praska uz razvoj plamena koji se smatra ekvivalentnim eksploziji) najmanje jedanput tokom bilo kog ispitivanja sa propisanom aparaturom za ispitivanje osetljivosti na trenje ili ukoliko zadovoljava ekvivalentne kriterijume koji se odnose na alternativno ispitivanje osetljivosti na trenje.

**2. PODACI**

U skladu sa ovim pravilnikom, supstanca ima potencijalnu opasnost od eksplozije ukoliko su dobijeni pozitivni rezultati u ispitivanju termičke osetljivosti, osetljivosti na udar ili trenje.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- identitetu, sastavu, stepenu čistoće, sadržaju vlage itd. ispitivane supstance;

- fizičkom obliku uzorka i da li je uzorak mrvljen, lomljen i/ili prosejavan;

- zapažanjima tokom ispitivanja termičke osetljivosti (npr. masa uzorka, broj fragmenata u koje se rasprsao uzorak itd.);

- zapažanjima tokom ispitivanja osetljivosti na udar ili trenje (npr. formiranje određene veće količine dima ili potpuno razlaganje bez praska, plamena, varnice, pucketanja i sl.);

- rezultatima svih tipova ispitivanja;

- ukoliko je korišćena alternativna aparatura, naučna opravdanja kao i dokaz o odnosu rezultata dobijenih primenom propisane aparature i onih dobijenih uz primenu ekvivalentne aparature;

- svim komentarima koji mogu biti od koristi za pravilno tumačenje rezultata kao što je referisanje na ispitivanje sličnih proizvoda;

- svim dodatnim primedbama relevantnim za pravilno tumačenje rezultata.

*3.2. TUMAČENJE I PROCENA REZULTATA*

U izveštaju o sprovedenim ispitivanjima navode se i rezultati koji se mogu smatrati lažnim, nepravilnim ili nereprezentativnim.

Ukoliko se neki rezultati odbacuju, daje se odgovarajuće objašnjenje i rezultati alternativnih ili dodatnih testova. Ukoliko se neki nepravilni rezultat ne može objasniti, on se prihvata kao nominalna vrednost i supstanca se adekvatno svrstava na osnovu njega.

**4. LITERATURA**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750 -60103-5, 1990.

3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

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

**Deo drugi**

**PRIMER SPECIFIKACIJE MATERIJALA ZA ISPITIVANJE TERMIČKE OSETLJIVOSTIXXV**

1) Cev: Specifikacija materijala br. 1.0336.505 g

2) Prigušnica: Specifikacija materijala br. 1.4873

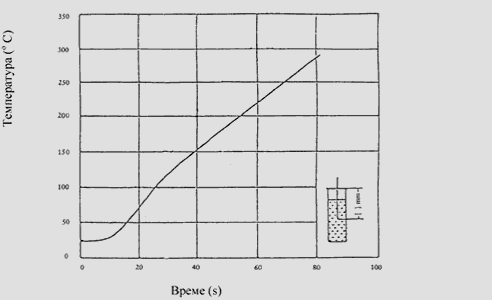
3) Navojnice: Specifikacija materijala br. 1.3817.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXV** Videti standard DIN 1623.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Slika 1. Aparatura za ispitivanje termičke osetljivosti (sve dimenzije date su u milimetrima) | | |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s031.gif | | |
|  | 1. Cev 2. Navojna obujmica 3. Prigušnica a = 2,0 ili 6,0 mm 4. Matica b = 10 mm 5. Površina sa žlebovima 6. Dve ravne površine za ključ 41 | 7. Dve ravne površine za ključ 36 8. Kućište otporno na rasprskavanje 9. Dve potporne šipke za cev sa uzorkom 10. Montirana cev sa uzorkom 11. Položaj zadnjeg plamenika (ostali plamenici se ne vide) 12. Mlaznica |

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 2. Ispitivanje termičke osetljivosti (primer fragmentacije) | |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s032.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s033.gif |
| Nema eksplozije | Nema eksplozije |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s034.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s035.gif |
| Eksplozija | Eksplozija |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s036.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s037.gif |
| Eksplozija | Eksplozija |

Slika 3. Kalibracija brzine zagrevanja za ispitivanje termičke osetljivosti



Kriva temperatura/vreme dobijena zagrevanjem dibutil ftalata (27 cm3) u zatvorenoj cevi (1,5 mm prigušnica) uz protok propana od 3,2 litra/minut. Temperatura se meri uz pomoć termopara hromel (legura hrom-nikal 9:1)/alumel (legura Ni : Al : Mn : Si 95 : 2 : 2 : 1) obloženog nerđajućim čelikom, koji se postavlja 43 mm ispod ivice cevi. Brzina zagrevanja između 135° C i 285° C treba da bude između 185 K/minut i 215 K/minut.

Slika 4. Aparatura za ispitivanje osetljivosti na udar (sve dimenzije su u milimetrima)

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 4a. Padajući malj, prednja i bočna strana | Slika 4b. Padajući malj donji deo |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s039.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s040.gif |
| Pri čemu je: 1. Postolje 450 x 450 x 60 2. Čelični blok 230 x 230 x 200 3. Nakovanj  100 x 70 4. Kolona 5. Srednji poprečni nosač 6. Vođice 7. Nazubljeni nosač | 8. Graduisana vaga 9. Padajući malj 10. Element za držanje i otpuštanje 11. Ploča za postavljanje u položaj 12. Međunakovanj (zamenjivi)  26 x 26 13. Prsten sa otvorima 14. Uređaj za udar |

|  |  |
| --- | --- |
| Slika 4c. Uređaj za ispitivanje osetljivosti  na udar za čvrste supstance i paste | Slika 4d. Uređaj za ispitivanje osetljivosti  na udar tečnih supstanci |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s041.gif | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s042.gif |
| Pri čemu je: 1. Čelični cilindri 2. Prstenasta vođica za čelične cilindre 3. Prsten sa otvorima za postavljanje u položaj 4. Gumeni prsten 5. Tečna supstanca 40 mm3 6. Prostor bez tečnosti | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s043.gif |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s083.gif | Slika 4e. Malj (masa koja pada 5 kg) Pri čemu je: 1. Prsten za kačenje 2. Pokazivač visine 3. Žleb za pozicioniranje 4. Cilindrična udarna glava 5. Odbojnik |
|  | |
| Slika 5. Uređaj za ispitivanje osetljivosti na trenje | |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s044.gif | |
| Pri čemu je: 1. Čelično postolje 2. Pokretna vođica 3. Porcelanska ploča (koju drži vođica) 25 mm x 25 mm x 5 mm 4. Fiksni porcelanski klin  10 mm x 15 mm 5. Uzorak koji se ispituje 10 mm3 6. Držač klina | 7. Ručka za punjenje 8. Protivteg 9. Sklopka 10. Kolo za postavljanje vođice u početni položaj 11. Pravac prema elektromotornom pogonu |

**A.15. TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA   
(ZA TEČNOSTI I GASOVE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ovom metodom se ne ispituju eksplozivne supstance i supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom na sobnoj temperaturi. Ispitivanje se primenjuje na gasove, tečnosti i isparenja koji u prisustvu vazduha mogu biti zapaljeni vrelom površinom.

Temperaturu samozapaljenja mogu značajno sniziti prisutne katalitičke nečistoće, površina materijala ili veća zapremina posude za ispitivanje.

*1.2. DEFINICIJE*

Stepen samozapaljivosti izražava se u vidu temperature samozapaljenja.

Temperatura samozapaljenja jeste najniža temperatura pri kojoj se ispitivana supstanca zapali kada se pomeša sa vazduhom u uslovima definisanim u ovoj metodi ispitivanja.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance navedene su u standardima (videti odeljak 1.6.3. ove metode). One prvenstveno služe za povremenu proveru metode i omogućavaju poređenje sa rezultatima drugih metoda.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ovom metodom određuje se minimalna temperatura unutrašnje površine kućišta koja dovodi do paljenja gasa, isparenja ili tečnosti ubrizganih u kućište.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost se menja u zavisnosti od opsega temperatura samozapaljenja i korišćene metode ispitivanja.

Osetljivost i specifičnost zavise od korišćene metode ispitivanja.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Aparatura**

Aparatura je opisana u metodama datim u odeljku 1.6.3. ove metode.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

Uzorak ispitivane supstance ispituje se u skladu sa metodama datim u odeljku 1.6.3. ove metode.

**1.6.3. Postupak ispitivanja**

Videti standard SRPS EN 60079-20-11:2011, Eksplozivne atmosfere - Deo 20-1: Klasifikacija materijalnih karakteristika gasova i para - Metode ispitivanja i podaci.

**2. PODACI**

Beleži se temperatura ispitivanja, atmosferski pritisak, količina korišćenog uzorka i vreme do pojave paljenja.

**3. IZVEŠTAVANJE**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- precizan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);

- količinu korišćenog uzorka i atmosferski pritisak;

- korišćenu aparaturu;

- rezultate merenja (temperature ispitivanja, rezultate koji se odnose na paljenje, odgovarajuće vreme do pojave paljenja);

- sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

**A.16. RELATIVNA TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA   
(ZA ČVRSTE SUPSTANCE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ovom metodom se ne ispituju eksplozivne supstance i supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom na sobnoj temperaturi.

Svrha ispitivanja jeste dobijanje preliminarnih podataka o samozapaljivosti čvrstih supstanci na povišenim temperaturama.

Ukoliko se toplota koja se oslobađa u reakciji supstance sa kiseonikom ili pri egzotermnom razlaganju ne odaje dovoljno brzo u okolinu, dolazi do njenog samozagrevanja koje dovodi do samozapaljenja. Samozapaljenje se javlja kada je brzina oslobađanja toplote veća od brzine odavanja toplote.

Ovaj postupak ispitivanja koristan je za preliminarno skrining ispitivanje čvrstih supstanci. S obzirom na složenu prirodu paljenja i sagorevanja čvrstih supstanci, temperatura samozapaljenja određena ovom metodom koristiti se samo za potrebe poređenja.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Temperatura samozapaljenja određena ovom metodom predstavlja minimalnu temperaturu okoline izraženu u stepenima Celzijusa (°C) pri kojoj se određena zapremina supstance zapali pod definisanim uslovima.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Određena zapremina supstance koja se ispituje stavlja se u peć na sobnoj temperaturi. Beleži se kriva odnosa vremena i temperature u centru uzorka dok se temperatura u peći podiže do 400° C ili do tačke topljenja ukoliko je niža od pomenute, brzinom 0,5° C/min.

Za potrebe ovog ispitivanja, temperatura samozapaljenja jeste temperatura peći pri kojoj temperatura uzorka dostiže 400° C samozagrevanjem.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Aparatura**

*1.6.1.1. Peć*

Laboratorijska peć sa mogućnošću programiranja temperature (zapremine oko 2 litra), sa prirodnom cirkulacijom vazduha i ispustom za slučaj eksplozije. Radi izbegavanja potencijalnog rizika od eksplozije, ne sme se dozvoliti da gasovi nastali razlaganjem dođu u dodir sa električnim grejnim elementima.

*1.6.1.2. Kocka od žičane mreže*

Parče žičane mreže od nerđajućeg čelika sa otvorima od 0,045 mm iseče se prema šablonu datom na Slici 1. Mreža se ispresavija i osigura žicom u oblik kocke sa otvorom na vrhu.

*1.6.1.3. Termoelementi*

Odgovarajući termopar.

*1.6.1.4. Zapisivanje rezultata*

Bilo koji dvokanalni sistem za zapisivanje kalibrisan od 0° C do 600° C ili na odgovarajući napon.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

Supstance se ispituju u obliku u kome su primljene.

**1.6.3. Postupak ispitivanja**

Kocka se puni supstancom koja se ispituje. Supstanca se blago sabija i dodaje dok se kocka potpuno ne popuni. Zatim se kocka okači u centar peći na sobnoj temperaturi. Jedan termoelement postavlja se u centar kocke, a drugi između kocke i zida peći da meri temperaturu u peći.

Temperature peći i uzorka neprekidno se beleže dok se temperatura u peći povećava do 400° C ili do tačke topljenja ukoliko je niža, brzinom 0,5° C/min.

Kada dođe do paljenja supstance, termoelement koji se nalazi u uzorku pokazuje veoma oštar porast temperature u odnosu na temperaturu u peći.

**2. PODACI**

Temperatura peći pri kojoj temperatura uzorka dostiže 400° C samozagrevanjem jeste temperatura relevantna za procenu (videti Sliku 2).

**3. IZVEŠTAVANJE**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- opis supstance koja se ispituje;

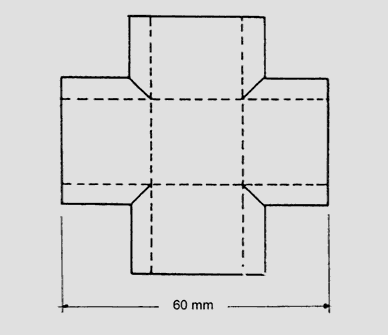
- rezultate merenja uključujući i krivu temperatura/vreme;

- sve dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.

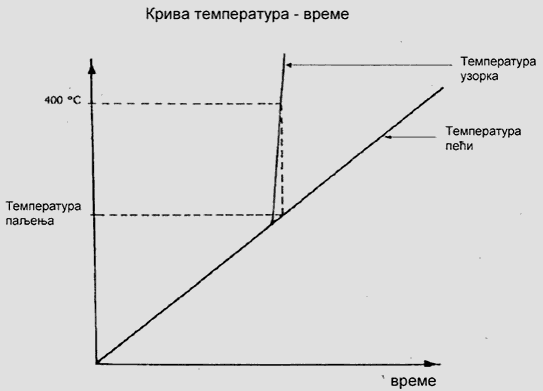
**4. LITERATURA**

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

Slika 1. Šema kocke (20 mm) za ispitivanje



Slika 2



**A.17. OKSIDUJUĆA SVOJSTVA   
(ZA ČVRSTE SUPSTANCE)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Pre nego što se pristupi ispitivanju korisno je imati podatke o potencijalnim eksplozivnim svojstvima supstance.

Ova metoda se ne primenjuje na tečnosti, gasove, eksplozivne ili lako zapaljive supstance i organske perokside.

Ovo ispitivanje se ne sprovodi kada se na osnovu strukturne formule dovoljno pouzdano može utvrditi da supstanca ne može da razvije egzotermnu reakciju u kontaktu sa zapaljivim materijalom.

Potrebno je izvršiti preliminarna ispitivanja radi provere da li ispitivanje treba vršiti pod posebnim uslovima.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Vreme gorenja jeste vreme reakcije, izraženo u sekundama, potrebno da se zona reakcije proširi kroz supstancu prema postupku opisanom u odeljku 1.6. ove metode.

Brzina gorenja izražava se u milimetrima po sekundi.

Maksimalna brzina gorenja jeste najviša vrednost brzine gorenja dobijena ispitivanjem smeša koje sadrže 10% do 90% (masenih) oksidujućeg sredstva.

*1.3. REFERENTNA SUPSTANCA*

Barijum-nitrat (analitičke čistoće) koristi se kao referentna supstanca pri ispitivanju i pri preliminarnom ispitivanju.

Referentna smeša jeste smeša barijum-nitrata sa sprašenom celulozom (obično smeša sa 60% (masenih) barijum-nitrata), pripremljena prema uputstvima iz odeljka 1.6. ove metode, koja ima maksimalnu brzinu gorenja.

*1.4. PRINCIPI METODE*

Preliminarno ispitivanje vrši se iz bezbednosnih razloga. Kada preliminarno ispitivanje jasno pokaže da ispitivana supstanca ima oksidujuća svojstva nema potrebe za daljim ispitivanjima. U suprotnom vrši se potpuni postupak ispitivanja supstance.

Kod potpunog ispitivanja, supstanca koja se ispituje i definisana zapaljiva supstanca mešaju se u različitim odnosima. Svaka tako napravljena smeša zatim se oblikuje u gomilu. Gomila se na jednom kraju zapali. Određena maksimalna brzina gorenja zatim se upoređuje sa maksimalnom brzinom gorenja referentne smeše.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ukoliko je potrebno, primenjuje se bilo koja metoda usitnjavanja i mešanja, ako se maksimalna brzina gorenja u šest odvojenih ispitivanja razlikuje od aritmetičke srednje vrednosti za najviše 10%.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

*1.6.1.1. Ispitivana supstanca*

Uzorak za ispitivanje usitniti do čestica veličine < 0,125 mm na sledeći način: prosejati ispitivanu supstancu, deo koji se zadržao na situ samleti, pa ponoviti ovaj postupak tako da sva količina uzorka prođe kroz sito.

Koristi se bilo koja metoda mlevenja i prosejavanja koja zadovoljava kriterijume kvaliteta.

Pre nego što se pripremi smeša, supstanca se suši na 105° C, do postizanja konstantne mase. Ukoliko je temperatura razlaganja supstance niža od 105° C, ona se suši na odgovarajućoj nižoj temperaturi.

*1.6.1.2. Zapaljiva supstanca*

Kao zapaljiva supstanca koristi se celuloza u prahu. U ovim ispitivanjima koristi se tip celuloze koja se koristi u hromatografiji na tankom sloju ili u kolonskoj hromatografiji. Kao najpodesnija pokazala se celuloza kod koje 85% vlakana ima dužinu između 0,020 mm i 0,075 mm. Celulozni prah pušta se kroz sito sa otvorima veličine 0,125 mm. Ista serija celuloze koristi se sve vreme ispitivanja.

Pre nego što se pripremi smeša, celulozni prah se suši na temperaturi od 105° C do postizanja konstantne mase.

Ukoliko se pri preliminarnom ispitivanju koristi drveno brašno, priprema se brašno od mekog drveta na taj način što se sakupi deo koji prolazi kroz sito otvora veličine 1,6 mm, promeša, zatim suši na temperaturi od 105° C četiri sata u sloju debljine manje od 25 mm. Brašno se ohladi i čuva u hermetički zatvorenoj posudi, napunjenoj količinom potrebnom za ispitivanje, ako je moguće u roku od 24 sata od sušenja.

*1.6.1.3. Inicijator paljenja*

Kao inicijator paljenja koristi se vreo plamen iz gasnog gorionika (minimalnog prečnika 5 mm). Ukoliko se koristi drugi inicijator paljenja (npr. kada se ispitivanje vrši u inertnoj atmosferi), u izveštaju se opisuje izvor i objašnjava zbog čega se koristi.

**1.6.2. Postupak ispitivanja**

Napomena: Smeše oksidujućih sredstava sa celulozom ili drvenim brašnom smatraju se potencijalno eksplozivnim materijama i njima se pažljivo rukuje.

*1.6.2.1. Preliminarno ispitivanje*

Osušena supstanca dobro se izmeša sa osušenom celulozom ili drvenim brašnom u odnosu dva težinska dela ispitivane supstance prema jednom težinskom delu celuloze ili drvenog brašna. Smeša se oblikuje u malu gomilu kupastog oblika dimenzija 3,5 cm (prečnik osnove) x 2,5 cm (visina) tako što se ispuni posuda u obliku kupe, bez sabijanja (npr. laboratorijski stakleni levak čija je cev zapušena).

Gomila se postavlja na hladno, nezapaljivo, neporozno ravno postolje koje slabo provodi toplotu. Ispitivanje se izvodi u digestoru kao što je opisano u odeljku 1.6.2.2. ove metode.

Inicijator paljenja dovodi se u kontakt sa kupom. Prate se i beleže intenzitet i trajanje reakcije.

Ako je reakcija burna supstanca se smatra oksidujućom.

U slučaju dobijanja sumnjivih rezultata, potrebno je izvršiti celu seriju ispitivanja.

*1.6.2.2. Serija ispitivanja*

Pripremiti smeše celuloze sa oksidujućom supstancom. Smeše sadrže od 10 do 90 masenih procenata oksidujuće supstance sa korakom povećanja 10%. U graničnim slučajevima koriste se srednje smeše oksidujuće supstance sa celulozom kako bi se preciznije dobila maksimalna brzina gorenja.

Gomila se pravi uz pomoć kalupa. Kalup je sačinjen od metala, dužine 250 mm, sa trouglastim poprečnim presekom, unutrašnje visine 10 mm, a širine 20 mm. Sa obe strane kalupa, uzdužno, postavljaju se dva metalna graničnika koji prelaze 2 mm iznad gornje ivice trouglastog poprečnog preseka (videti Sliku). Ova posuda se napuni sa većom količinom smeše. Nakon što se kalup baci sa visine od 2 cm na čvrstu podlogu, preostali višak supstance ukloni se pomoću koso postavljene ploče.

Bočni graničnici se uklone, a ostatak praškaste materije poravna se pomoću valjka.

Nezapaljivo, neporozno postolje koja slabo provodi toplotu zatim se postavlja na vrh kalupa, cela aparatura se obrne, a kalup se ukloni.

Ovako formirana gomila stavlja se u digestor.

Brzina vazduha treba da bude dovoljna da se izbegne širenje dima po laboratoriji i ne treba da se menja u toku ispitivanja. Oko aparature se podiže zaštita od promaje.

S obzirom da su celuloza, kao i neke supstance koje se ispituju higroskopne, ispitivanje se vrši što je brže moguće.

Zapaliti jedan deo gomile uz pomoć plamena.

Meriti vreme trajanja reakcije na dužini od 200 mm, nakon što se zona reakcije proširi 30 mm od inicijalne tačke.

Ispitivanje se vrši sa referentnom supstancom i najmanje po jednom sa svakom od smeša ispitivane supstance sa celulozom.

Ukoliko je maksimalna brzina gorenja znatno veća od brzine gorenja referentne smeše, ispitivanje se može obustaviti. U suprotnom, ispitivanje se ponavlja pet puta sa svakom od tri smeše koje imaju najveće brzine gorenja.

Ukoliko se posumnja u verodostojnost pozitivnog rezultata, ispitivanje se ponavlja sa inertnom supstancom sa sličnom veličinom čestica, kao što je dijatomejska zemlja, umesto celuloze. Druga mogućnost je ispitivanje smeše koja sadrži celulozu i koja ima najveću brzinu gorenja, u inertnoj atmosferi (sadržaj kiseonika < 2% v/v).

**2. PODACI**

Iz bezbednosnih razloga karakterističnim oksidujućim svojstvom ispitivane supstance smatra se maksimalna brzina gorenja, a ne njena srednja vrednost.

Vrednost relevantna za procenu jeste najveća dobijena vrednost brzine gorenja od šest ispitivanja određene smeše.

Nacrtati grafik zavisnosti najveće vrednosti brzine gorenja od koncentracije oksidujuće supstance.

Maksimalna brzina gorenja očitava se sa grafika.

Šest izmerenih vrednosti brzine gorenja koje se odnose na smešu sa najvećom brzinom gorenja ne smeju da se razlikuju od aritmetičke srednje vrednosti za više od 10%. U suprotnom, poboljšavaju se metode usitnjavanja i mešanja supstance.

Uporediti maksimalne brzine gorenja ispitivane i referentne smeše (videti odeljak 1.3. ove metode).

Ukoliko se ispitivanja sprovode u inertnoj atmosferi, maksimalna brzina reakcije poredi se sa brzinom reakcije referentne smeše izmerene u inertnoj atmosferi.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- identitetu, sastavu, stepenu čistoće, sadržaju vlage ispitivane supstance;

- obradi uzorka za ispitivanje (npr. mlevenje, sušenje i dr.);

- inicijatoru paljenja korišćen pri ispitivanju;

- rezultatima merenja;

- načinu reakcije (npr. blesak i gorenje po površini, gorenje cele mase, podatke o proizvodima sagorevanja, itd.);

- svim primedbama značajnim za tumačenje rezultata, uključujući i opis intenziteta reakcije (plamen, varnice, dim, slabo tinjanje, itd.) i približnu dužinu trajanja koja je dobijena pri preliminarnom ispitivanju iz bezbednosnih razloga/skrining ispitivanja za ispitivanu i referentnu supstancu;

- rezultatima ispitivanja sa inertnom supstancom, ako postoje;

- rezultatima ispitivanja sprovedenih u inertnoj atmosferi, ako postoje.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Supstanca se smatra oksidujućom kada:

a) pri preliminarnom ispitivanju dođe do snažne reakcije;

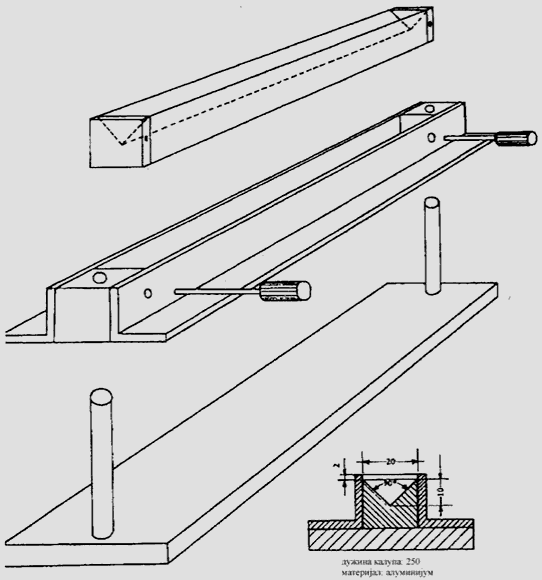
b) pri potpunom ispitivanju, maksimalna brzina gorenja ispitivane smeše je veća ili jednaka maksimalnoj brzini gorenja referentne smeše celuloze i barijum-nitrata.

Da se izbegnu lažni pozitivni rezultati, uzimaju se u obzir i rezultati dobijeni ispitivanjem supstance u smeši sa nekim inertnom materijalom i/ili kada se ispituje u inertnoj atmosferi.

**4. LITERATURA**

NF T 20-035 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the oxidising properties of solids

Slika: Kalup i pribor za pripremu gomile (sve dimenzije date su u milimetrima)



**A.18. SREDNJE MOLEKULSKE MASE I RASPODELA MOLEKULSKIH MASA POLIMERA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Opisana metoda gel propusne hromatografije zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 118 (1996). Osnovni principi metode i detaljne tehničke informacije date su u literaturi**1**.

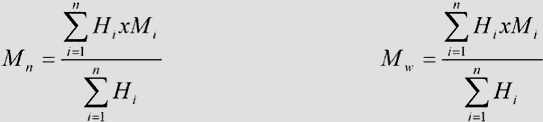
*1.1. UVOD*

Polimeri imaju različita svojstva. Iz navedenog razloga nemoguće je dati jednu metodu koja postavlja precizne uslove za razdvajanje i procenu i koja pokriva sve mogućnosti i sve specifičnosti razdvajanja polimera. Ovo posebno važi za složene polimerne sisteme na koje se često ne može primeniti gel propusna hromatografija (Gel permeation chromatography, u daljem tekstu: GPC). Kada nije moguće primeniti GPC molekulska masa se određuje primenom drugih metoda (videti Deo drugi ove metode). U takvim slučajevima, opisuju se svi detalji i navode razlozi zbog kojih se koristi druga metoda.

Metoda koja je opisana zasniva se na standardu SRPS ISO 138851. U ovom standardu date su detaljne informacije o izvođenju eksperimenata i evaluaciji dobijenih podataka. Kada je neophodno izmeniti eksperimentalne uslove, ove izmene se opravdavaju. Koriste se i drugi standardi ukoliko imaju reference. Uzorci polistirena, čija je poludisperzivnost poznata, koriste se za kalibraciju prema ovoj metodi. Metoda se može izmeniti kako bi odgovarala određenim polimerima, npr. polimerima rastvornim u vodi i dugolančanim razgranatim polimerima.

*1.2. DEFINICIJE*

Srednja molekulska masa po brojnoj zastupljenosti (u daljem tekstu: Mn) i srednja molekulska masa po masenoj zastupljenosti (u daljem tekstu: Mw) određuju se na osnovu jednačina:



pri čemu:

Hi jeste nivo detektorskog signala od bazne linije za retencionu zapreminu Vi;

Mi jeste molekulska masa frakcije polimera pri retencionoj zapremini Vi;

*n* jeste broj relevantnih podataka.

Opseg raspodele molekulske mase koji predstavlja meru disperzije sistema dat je kroz odnos Mw / Mn.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

GPC je relativna metoda, pa se vrši kalibracija. Za kalibraciju se najčešće koriste standardi linearnog polistirena sa poznatim prosečnim molekulskim masama Mn i Mw i sa poznatom uskom distribucijom molekulske mase. Kalibraciona kriva koristi se samo pri određivanju molekulske mase nepoznatog uzorka ukoliko su uslovi za razdvajanje uzorka i standarda izabrani na identičan način.

Određeni odnos molekulske mase i zapremine eluata validan je jedino pod definisanim uslovima određenog eksperimenta. Navedeni uslovi obuhvataju, pre svega, temperaturu, rastvarač (smešu rastvarača), uslove hromatografije i kolonu za razdvajanje ili sistem kolona za razdvajanje.

Molekulske mase uzorka određene na ovaj način jesu relativne vrednosti i nazivaju se: "molekulske mase ekvivalentne polistirenu". Ovo znači da u zavisnosti od strukturnih i hemijskih razlika između uzorka i standarda, molekulske mase mogu odstupati od apsolutnih vrednosti u većem ili manjem stepenu. Ukoliko se koriste drugi standardi, npr. poli(etilenglikol), poli(etilen-oksid), poli(metil-metakrilat), poliakrilna kiselina, navode se razlozi za ovo korišćenje.

*1.4. PRINCIPI METODE*

Raspodele molekulske mase uzorka i srednje molekulske mase (Mn, Mw) određuju se primenom GPC. GPC je poseban tip tečne hromatografije kojom se uzorak odvaja na osnovu hidrodinamičkih zapremina pojedinačnih sastojaka.**2**

Razdvajanje se postiže tako što uzorak prolazi kroz kolonu ispunjenu poroznim materijalom, najčešće nekim organskim gelom. Mali molekuli mogu da prođu kroz pore dok veliki molekuli ne mogu. Put koji prolaze veliki molekuli je kraći i oni prvi izlaze sa kolone. Molekuli srednje veličine prolaze kroz neke od pora i eluiraju se kasnije. Najmanji molekuli, sa prosečnim hidrodinamičkim prečnikom manjim od pora gela, mogu ući u sve pore i oni se eluiraju poslednji.

U idealnim uslovima, na razdvajanje utiče jedino veličina molekula, ali u praksi je teško izbeći uticaj apsorpcionih efekata.

Neujednačena pakovanja kolona i mrtve zapremine mogu da pogoršaju situaciju**2**.

Supstance se detektuju pomoću indeksa refrakcije ili UV apsorpcijom i na taj način se dobija prosta kriva raspodele. Da bi se odredile stvarne vrednosti molekulskih masa, neophodno je kalibrisati kolonu propuštanjem polimera čije su molekulske mase poznate i, idealno, takvih struktura koje su slične sa strukturama mnogih drugih polimera, kao npr. različiti standardi polistirena. Najčešći rezultat je Gausova kriva, koja je ponekad deformisana malim repom na strani gde se nalaze vrednosti malih molekulskih masa. Vertikalna osa označava količinu, prema masi, čestica različitih molekulskih masa koje su eluirane, a horizontalna osa označava logaritam molekulske mase.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost (Relativna standardna devijacija, u daljem tekstu: RSD) eluirane zapremine treba da bude bolja od 0,3%. Zahtevana ponovljivost analiza obezbeđuje se korekcijom internim standardom ako se hromatogram procenjuje na osnovu vremena zadržavanja i ako ne odgovara navedenom kriterijumu**1**. Polidisperzivnost zavisi od molekulskih masa standarda. Tipične vrednosti za polistirenske standarde su:

|  |  |
| --- | --- |
| Mp < 2000 | Mw/Mn < 1,20 |
| 2000 < Mp < 106 | Mw/Mn < 1,05 |
| Mp > 106 | Mw/Mn< 1,20 |

pri čemu:

Mp jeste molekulska masa standarda na maksimumu pika.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema standardnih rastvora polistirena**

Standardi polistirena rastvaraju se pažljivim mešanjem u izabranom eluentu. Pri pripremanju rastvora uzimaju se u obzir preporuke proizvođača.

Koncentracije izabranih standarda zavise od različitih faktora, npr. zapremine koja se injektuje, viskoziteta rastvora i osetljivosti detektora. Maksimalna zapremina koja se injektuje prilagođava se dužini kolone, da se izbegne preopterećenje. Tipične vrednosti zapremina koje se injektuju pri analitičkim razdvajanjima pomoću GPC za kolone dimenzija 30 cm x 7,8 mm kreću se između 40 ml i 100 ml. Koriste se i veće zapremine, ali one ne treba da pređu vrednost od 250 ml. Optimalni odnos između injektovane zapremine i koncentracije određuje se pre kalibracije kolone.

**1.6.2. Priprema rastvora uzorka**

Na pripremu rastvora uzoraka primenjuju se isti zahtevi kao i za standardne rastvore. Uzorak se pažljivim mućkanjem rastvara u odgovarajućem rastvaraču, npr. tetrahidrofuranu (u daljem tekstu: THF). Korišćenje ultrazvučne kade za rastvaranje ne preporučuje se. Kada je neophodno, rastvor uzorka se prečišćava pomoću membranskog filtera veličine pora između 0,2 mm i 2 mm.

Prisustvo nerastvornih čestica navodi se u završnom izveštaju jer se one mogu pojaviti usled prisustva čestica velike molekulske mase. Za određivanje masenog procenta nerastvornih čestica primenjuje se odgovarajuća metoda. Rastvori se koriste u roku od 24 sata.

**1.6.3. Aparatura**

Aparaturu čine:

- posuda za rastvarač;

- uređaj za degaziranje (ako je potreban);

- pumpa;

- pulsni prigušivač (ako je potreban);

- sistem za injektovanje;

- hromatografske kolone;

- detektor;

- merač protoka (ako je potreban);

- procesor za prikupljanje podataka;

- posuda za prikupljanje otpada.

Potrebno je obezbediti da GPC sistem bude inertan prema korišćenom rastvaraču (npr. upotreba čeličnih kapilara za tetrahidrofuran).

**1.6.4. Sistem za injektovanje i uvođenje rastvarača**

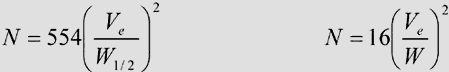
Određena zapremina rastvora uzorka uvodi se u kolonu pomoću automatskog unošenja uzorka ili ručno u precizno određenoj zoni. Prebrzo povlačenje ili pritiskanje klipa šprica, ukoliko se vrši ručno, može dovesti do promena u ispitivanoj raspodeli molekulskih masa. Sistem za uvođenje rastvarača treba u najvećoj mogućoj meri da bude oslobođen od pulsiranja, ako je moguće tako što će sadržati pulsni prigušivač. Brzina protoka treba da bude u okviru 1 ml/min.

**1.6.5. Kolona**

U zavisnosti od uzorka, određivanje polimera vrši se upotrebom ili jedne kolone ili više međusobno povezanih kolona u nizu. Komercijalno su dostupni brojni porozni materijali za kolone sa definisanim svojstvima (npr. veličina pora, ekskluzioni limit - gornja granica molekulske mase iznad koje će se molekuli eluirati u retencionoj zapremini). Izbor gela za razdvajanje ili dužine kolone zavise od svojstava uzorka (hidrodinamičke zapremine, raspodele molekulske mase) i specifičnih uslova za razdvajanje kao što su: rastvarač, temperatura i brzina protoka**1,2,3**.

**1.6.6. Teorijski podovi**

Za kolonu ili kombinaciju kolona koje se koriste za razdvajanje određuje se broj teorijskih podova. To podrazumeva, u slučaju primene THF-a kao rastvarača, nanošenje rastvora etilbenzena ili druge odgovarajuće nepolarne rastvorene supstance na kolonu poznate dužine. Broj teorijskih podova određuje se pomoću jednačine:



pri čemu:

*N* jeste broj teorijskih podova;

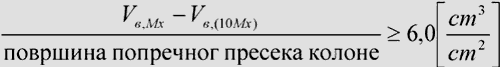
*V*e jeste eluciona zapremina na maksimumu pika;

*W* jeste širina pika na baznoj liniji;

*W*1/2 jeste širina pika na polovini visine.

**1.6.7. Efikasnost razdvajanja**

Pored broja teorijskih podova koji kvantitativno određuje širinu traka, važnu ulogu ima i efikasnost razdvajanja, koja je određena nagibom kalibracione krive. Efikasnost razdvajanja kolona dobija se na osnovu odnosa:

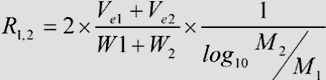


pri čemu:

*V*e.Mx jeste eluciona zapremina polistirena molekulske mase Mx;

*V*e (10Mx) jeste eluciona zapremina polistirena sa deset puta većom molekulskom masom.

Rezolucija sistema definiše se kao:



pri čemu,

*V*e1 i *V*e2 jesu elucione zapremine dva standarda polistirena na maksimumu pika;

*W*1 i *W*2 jeste širina pikova na baznoj liniji;

*M*1 i *M*2 jesu molekulske mase na maksimumu pika (treba da se razlikuju za faktor 10).

*R*-vrednost za sistem kolona treba da bude veća od 1,7 (videti u literaturi**4**).

*1.6.8. Rastvarači*

Svi rastvarači treba da budu visoke čistoće (koristi se THF čistoće 99,5%). Posuda za rastvarač (ukoliko je neophodno u atmosferi inertnog gasa) treba da bude dovoljna za kalibraciju kolone i nekoliko analiza uzorka. Rastvarač se degazira pre nego što se ubaci u kolonu pomoću pumpe.

*1.6.9. Kontrola temperature*

Temperatura kritičnih unutrašnjih delova (petlje za injektovanje, kolone, detektora i cevi) treba da bude konstantna i u skladu sa izabranim rastvaračem.

*1.6.10. Detektor*

Svrha detektora je da beleži koncentraciju uzorka eluiranog sa kolone. Da bi se izbeglo nepotrebno širenje pikova, zapremina kivete ćelije detektora treba da bude što je moguće manja. Ona ne sme biti veća od 10 ml, osim u slučaju detektora zasnovanih na rasipanju svetlosti i viskoznosti. Za detekciju se najčešće koristi diferencijalna refraktometrija. Ukoliko uzorak ili rastvarač imaju neka posebna svojstva mogu se koristiti i druge vrste detektora, kao npr. UV/VIS, IC, detektor viskoznosti i sl.

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

*2.1. PODACI*

Standard SRPS ISO 13885**1** služi kao literatura za detalje o kriterijumima za procenu, kao i u vezi zahteva za prikupljanje i obradu podataka.

Za svaki uzorak se vrše dva nezavisna eksperimenta. Oni se odvojeno analiziraju.

Mn, Mw, Mw/Mn i Mp se daju za svako merenje. Neophodno je jasno naznačiti da izmerene vrednosti predstavljaju relativne vrednosti ekvivalentne molekulskim masama korišćenih standarda.

Nakon što se odrede retencione zapremine ili retenciona vremena (mogu se korigovati pomoću internih standarda), na grafik se ucrtavaju ove vrednosti prema logaritmu Mp vrednosti (pri čemu je Mp maksimum pika kalibracionog standarda). Potrebne su najmanje dve tačke za kalibraciju u dekadnom opsegu molekulskih masa (1 kD-10 kD, 10 kD-100 kD, 100 kD-1.000 kD) i najmanje pet mernih tačaka za ceo grafik koje pokrivaju raspon očekivanih molekulskih masa. Krajnja tačka male molekulske mase na kalibracionoj krivoj definiše se *n*-heksilbenzenom ili nekim drugim odgovarajućim nepolarnim rastvaračem. Srednje molekulske mase po brojnoj zastupljenosti i po masenoj zastupljenosti određuju se elektronskom obradom podataka na osnovu formula datih u odeljku 1.2. ove metode, a mogu se određivati i ručno**XXVI**. Kriva raspodele se daje u obliku tabele ili slike (diferencijalna frekvencija ili zbir procentualnih iznosa prema vrednosti log M). Kod grafičkog prikaza jedan dekadni opseg molekulskih masa treba da bude širine oko 4 cm, a maksimalna visina pika da iznosi 8 cm. U slučaju integraljenja krive raspodele razmak ordinate između 0% i 100% treba da bude oko 10 cm.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXVI** Može se koristiti ASTM D 3536-91

*2.2. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

2.2.1. Ispitivanoj supstanci:

- poznate podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće);

- opis obrade uzorka, zapažanja, problemi.

2.2.2. Instrumentima:

- posuda za rastvarač, inertni gas, degaziranje eluenta, sastav eluenta, nečistoće;

- pumpa, pulsni prigušivač, sistem za injektovanje;

- hromatografske kolone (proizvođač, informacije o karakteristikama kolona kao što su: veličina pora, vrsta materijala za odvajanje itd., broj, dužina i redosled upotrebljenih kolona);

- broj teorijskih podova kolone (ili kombinacije), efikasnost razdvajanja (rezolucija sistema);

- podatke o simetriji pikova;

- temperatura kolona, način kontrole temperature;

- detektor (princip merenja, vrsta, zapremina kivete);

- merač protoka ukoliko je korišćen (proizvođač, princip merenja);

- sistem za prikupljanje i obradu podataka (hardver, softver).

2.2.3. Kalibraciji sistema:

- detaljan opis metode korišćene u izradi kalibracione krive;

- podatke o kriterijumima kvaliteta koji se odnose na ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, greška metodom najmanjih kvadrata, itd.);

- podatke o svim primenjenim ekstrapolacijama, pretpostavkama i aproksimacijama prilikom ispitivanja, proceni i obradi podataka;

- sva merenja korišćena pri izradi kalibracione krive se dokumentuju u vidu tabele koja sadrži sledeće podatke za svaku kalibracionu tačku:

(-) ime uzorka;

(-) ime proizvođača uzorka;

(-) karakteristične vrednosti standarda Mp, Mn, Mw, Mw/Mn onako kako ih je dostavio proizvođač ili koje su izvedene na osnovu dodatnih merenja, zajedno sa detaljima o metodi njihovog određivanja;

(-) injektovanu zapreminu i injektovanu koncentraciju uzorka;

(-) Mp vrednost koja je korišćena za kalibraciju;

(-) elucionu zapreminu ili korigovano retenciono vreme izmereno na maksimumu pika;

(-) Mp izračunato na maksimumu pika;

(-) procentualnu grešku izračunate vrednosti Mp i kalibrisane vrednosti.

2.2.4. Proceni:

- procena na osnovu retencionog vremena: metode koje se koriste da bi se obezbedila neophodna reproduktivnost (metoda korekcije, interni standardi, itd.);

- podatak o tome da li je evaluacija izvršena na osnovu elucione zapremine ili na osnovu retencionog vremena;

- podatke o granicama procene ako pikovi nisu potpuno analizirani;

- opis metode poravnavanja, ukoliko su korišćene;

- priprema i postupci prethodne obrade uzorka;

- prisustvo nerastvornih čestica, ukoliko su prisutne;

- injektovana zapremina (m1) i injektovana koncentracija uzorka(mg/ml);

- zapažanja koja ukazuju na efekte koji dovode do odstupanja od idealnog GPC profila;

- detaljan opis svih izmena u postupku ispitivanja;

- detalji o opsezima greške;

- bilo koje druge podatke i zapažanja relevantni za tumačenje rezultata.

**3. LITERATURA**

1. SRPS ISO 13885-1:2011, Punioci za boje i lakove - Gel propustljiva hromatografija - Deo I: tetrahidrofuran kao eluent

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds., (1979) Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

**Deo drugi**

**PRIMERI DRUGIH METODA ZA ODREĐIVANJE SREDNJE MOLEKULSKE MASE PO BROJNOJ ZASTUPLJENOSTI (Mn) ZA POLIMERE**

Gel propusna hromatografija (GPC) je preporučena metoda (posebno kada je dostupan set standarda koji ima sličnu strukturu kao i polimer) za određivanje vrednosti Mn. Kada postoje praktični problemi koji onemogućuju upotrebu ove metode ili ako se očekuje da supstanca neće ispuniti Mn kriterijume (što treba da bude potvrđeno) mogu se koristiti raspoložive alternativne metode, kao što su:

**1. UPOTREBA KOLIGATIVNIH SVOJSTAVA**

*1.1. Ebulioskopija/krioskopija*

Ova metoda obuhvata merenja povišenja tačke ključanja (ebulioskopija) ili sniženje tačke mržnjenja (krioskopija) rastvarača kada se doda polimer. Zasniva se na činjenici da uticaj rastvorenog polimera na tačku ključanja/mržnjenja tečnosti zavisi od molekulske mase polimera**1,2**. Primenljivost, za Mn < 20.000.

*1.2. Sniženje napona pare*

Ova metoda obuhvata merenje napona pare izabrane referentne tečnosti pre i posle dodavanja poznatih količina polimera**1,2**.

Primenljivost za Mn < 20.000 (teoretski, u praksi limitirana vrednost).

*1.3. Membranska osmometrija*

Ova metoda se zasniva na principu osmoze, tj. prirodnoj težnji molekula rastvarača da kroz polupropustljivu membranu pređu iz razblaženog u koncentrovani rastvor da bi se uspostavila ravnoteža. Pri ispitivanju, razblaženi rastvor ima koncentraciju nula, dok koncentrovani rastvor sadrži polimer. Efekat prolaska rastvarača kroz membranu dovodi do razlike u pritiscima što zavisi od koncentracije i molekulske mase polimera**1,3,4**.

Primenljivost, za Mn između 20.000 i 200.000.

*1.4. Osmometrija parne faze*

Ova metoda podrazumeva poređenje brzine isparavanja čistog aerosola rastvarača i najmanje tri aerosola koji sadrže polimer u različitim koncentracijama**1,5,6**.

Primenljivost za Mn < 20.000.

**2. ANALIZA TERMINALNIH GRUPA**

Da bi se koristila ova metoda potrebno je poznavanje strukture polimera i vrste terminalnih grupa u njegovom lancu (koje se razlikuju od osnovnog lanca npr. pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR) ili titracije/derivatizacije). Utvrđivanje molekulske koncentracije grupa kojima se završava polimerni lanac koristi se za utvrđivanja molekulske mase**7,8,9**.

Primenljivost za Mn do 50.000 (uz smanjenu pouzdanost).

**3. LITERATURA**

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

2. Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3. ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weightof Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J.Wiley and Sons, pp. 25-52.

5. ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6. Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R.Cooper ed., John Wiley and Sons.

7. Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8. Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9. Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

**A.19. SADRŽAJ MOLEKULA SA MALIM MOLEKULSKIM MASAMA U POLIMERU**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda gel propusne hromatografije zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 119 (1996). Osnovni principi metode i detaljnije tehničke informacije date su u literaturi.

*1.1. UVOD*

Polimeri imaju različita svojstva. Zbog navedenog nemoguće je dati jednu metodu koja postavlja precizne uslove za razdvajanje i procenu i koja pokriva sve mogućnosti i sve specifičnosti koje se javljaju tokom razdvajanja polimera.

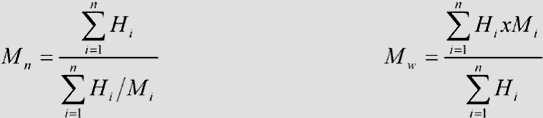
Posebno važi za složene polimerne sisteme na koje se često ne može primeniti gel propusna hromatografija (Gel permeation chromatography, u daljem tekstu: GPC). Kada nije moguće primeniti GPC molekulska masa se određuje primenom drugih metoda (videti Deo drugi ove metode). U takvim slučajevima opisuju se svi detalji i navode razlozi zbog kojih se koristi druga metoda.

Opisana metoda zasniva se na Standardu SRPS ISO 13885**1**. Detaljne informacije o izvođenju eksperimenta i načinu procene dobijenih podataka date su u navedenom standardu. U slučaju da je neophodno izvršiti izmenu eksperimentalnih uslova, ove izmene se opravdavaju. Koriste se i drugi standardi ukoliko su potpuno navedeni u literaturi. Metoda koja je data koristi polistirenske uzorke poznate polidisperzivnosti za kalibraciju, ali se modifikuje, ako je neophodno, kako bi odgovarala određenim polimerima, npr. polimerima rastvornim u vodi ili dugolančanim razgranatim polimerima.

*1.2. DEFINICIJE*

Molekuli sa malim molekulskim masama jesu molekuli sa molekulskom masom ispod 1.000 daltona.

Srednja molekulska masa po brojnoj zastupljenosti Mn i srednja molekulska masa po masenoj zastupljenosti Mw određuju se prema jednačinama:



pri čemu:

Hi jeste nivo signala detektora od bazne linije za retencionu zapreminu Vi;

Mi jeste molekulska masa frakcije polimera pri retencionoj zapremini Vi;

*n* jeste broj relevantnih tačaka.

Opseg raspodele molekulskih masa koji predstavlja meru disperzije sistema dat je kroz odnos Mw/Mn.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

GPC je relativna metoda. Zbog navedenog se vrši kalibracija. Za kalibraciju se najčešće koriste standardi linearnog polistirena sa poznatim prosečnim molekulskim masama Mn i Mw i sa poznatom uskom distribucijom molekulske mase. Kalibraciona kriva se koristi samo za određivanje molekulske mase nepoznatog uzorka ukoliko su uslovi za razdvajanje uzorka i standarda odabrani na identičan način.

Određeni odnos molekulske mase i elucione zapremine validan je samo pod specifičnim uslovima određenog eksperimenta. Ovi uslovi obuhvataju, između ostalog, temperaturu, rastvarač (ili smešu rastvarača), uslove hromatografije i kolonu za razdvajanje ili sistem kolona.

Molekulske mase uzorka utvrđene na ovaj način jesu relativne vrednosti i nazivaju se: "molekulske mase koje odgovaraju polistirenu". Navedeno znači da u zavisnosti od strukturnih i hemijskih razlika između uzorka i standarda, molekulske mase mogu da odstupaju od apsolutnih vrednosti u manjoj ili većoj meri. Ukoliko se koriste drugi standardi, npr. poli(etilenglikol), poli(etilenoksid), poli(metil-metakrilat), poliakrilna kiselina, navode se i razlozi za njihovo korišćenje.

*1.4. PRINCIP METODE*

GPC metodom određuje se raspodela molekulske mase uzorka i srednje molekulske mase (Mn i Mw). GPC jeste posebna vrsta tečne hromatografije kod koje se uzorak razdvaja na osnovu hidrodinamičkih zapremina pojedinačnih sastojaka**2**.

Razdvajanje se zasniva na prolasku uzorka kroz kolonu ispunjenu nekim poroznim materijalom, obično nekim organskim gelom. Manji molekuli mogu da uđu u pore dok veliki molekuli prolaze bez zadržavanja. Put koji prolaze veći molekuli je kraći te oni prvi silaze sa kolone. Molekuli srednje veličine ulaze u neke od pora i oni kasnije silaze sa kolone. Najmanji molekuli, sa prosečnim hidrodinamičkim poluprečnikom manjim od pora gela, mogu da uđu u sve pore. Stoga oni poslednji silaze sa kolone.

U idealnim uslovima na razdvajanje utiče samo veličina molekula, ali u praksi je teško izbeći uticaj apsorpciopnih efekata. Neujednačena pakovanja kolona i mrtve zapremine mogu da pogoršaju situaciju**2**.

Detekcija se vrši pomoću indeksa refrakcije ili UV apsorpcije, a rezultat je prosta kriva raspodele. Da bi se na krivu unele stvarne molekulske mase neophodno je da kolone budu kalibrisane tako što će kroz njih proći polimeri čija je molekulska masa poznata i, koji u idealnim uslovima, imaju sličnu strukturu kao što su različiti polistirenski standardi. Najčešće se dobija Gausova kriva, koju ponekad narušava mali rep na kraju na kome se nalaze male molekulske mase. Vertikalna osa krive predstavlja količinu, po težini, eluiranih molekula različitih masa, dok horizontalna osa predstavlja logaritamsku vrednost molekulskih masa.

Sadržaj molekula malih molekulskih masa očitava se sa navedene krive. Ovo računsko izvođenje je tačno samo ako molekuli različitih malih molekulskih masa odgovaraju, na osnovu mase, polimeru kao celini.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost (Relativna standardna devijacija) elucione zapremine treba da bude veća od 0,3%. Zahtevana ponovljivost analiza obezbeđuje se korekcijom internim standardom ukoliko se hromatogram procenjuje na osnovu retencionih vremena i ne odgovara navedenom kriterijumu**1**. Polidisperzivnost zavisi od molekulskih masa standarda. Tipične vrednosti za polistirenske standarde su:

|  |  |
| --- | --- |
| Mp < 2000 | Mw/Mn < 1.20 |
| 2000 ≤ Mp ≤ 106 | Mw/Mn < 1.05 |
| Mp > 106 | Mw/Mn < 1.20 |

pri čemu:

Mp jeste molekulska masa standarda na maksimumu pika.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema standardnih rastvora polistirena**

Standardi polistirena rastvaraju se pažljivim mešanjem u izabranom eluentu. Pri pripremanju rastvora uzimaju se u obzir preporuke proizvođača. Koncentracije izabranih standarda zavise od različitih faktora, npr. zapremine koja se injektuje, viskoziteta rastvora i osetljivosti analitičkog detektora. Maksimalna zapremina koja se injektuje prilagođena je dužini kolone, tako da se izbegne preopterećenje.

Tipične zapremine injektiranja za analitička razdvajanja u metodi gel propusne hromatografije, sa kolonama dimenzija 30 cm x 7,8 mm, kreću se između 40 ml i 100 ml. Moguće su i veće zapremine, ali one ne bi trebalo da prelaze 250 ml. Optimalni odnos između injektovane zapremine i koncentracije određuje se pre kalibracije kolona.

**1.6.2. Priprema rastvora uzorka**

Na pripremu rastvora uzorka primenjuju se isti zahtevi kao i za pripremu standardnih rastvora. Uzorak se rastvara u odgovarajućem rastvaraču, npr. tetrahidrofuranu (u daljem tekstu: THF), pažljivim mućkanjem. Ne preporučuje se korišćenje ultrazvučne kade za rastvaranje. Kada je neophodno, rastvor uzorka se prečišćava pomoću membranskog filtera veličine pora između 0,2 mm i 2 mm.

Prisustvo nerastvornih čestica navodi se u završnom izveštaju jer se one mogu pojaviti usled prisustva čestica velike molekulske mase. Za određivanje masenog procenta nerastvornih čestica primenjuje se odgovarajuća metoda. Rastvori se koriste u roku od 24 h.

**1.6.3. Korekcija sadržaja zbog prisutnih nečistoća i aditiva**

Obično se vrši korekcija sadržaja molekula čija je M < 1.000 zbog udela specifičnih komponenti koje nisu polimeri, a koje su prisutne u rastvoru (npr. nečistoće i/ili aditivi), izuzev ukoliko izmereni sadržaj nije < 1%. Ovo se postiže direktnim analizama rastvora polimera ili eluata. U slučajevima kada je eluent, nakon prolaska kroz kolonu, previše razblažen da bi se mogao analizirati, on se koncentruje. Nekada treba eluent upariti do suvog, pa zatim ponovo rastvoriti. Koncentrovanje eluenta se vrši pod takvim uslovima da se spreče sve moguće izmene njegovog sastava. Obrada eluenta dobijenog metodom gel propusne hromatografije zavisi od analitičke metode koja se koristi za kvantitativno određivanje.

**1.6.4. Aparatura**

GPC aparatura se sastoji od:

- posude za rastvarač;

- uređaja za degaziranje (kada je neophodno);

- pumpe;

- pulsnog prigušivača (kada je neophodno);

- sistema za injektovanje;

- hromatografske kolone;

- detektora;

- merača protoka (kada je neophodno);

- procesora za prikupljanje podataka;

- posude za prikupljanje otpada.

Potrebno je obezbediti da GPC sistem bude inertan prema korišćenom rastvaraču (npr. upotreba čeličnih kapilara za THF kao rastvarač).

**1.6.5. Sistem za injektovanje i uvođenje rastvarača**

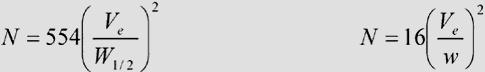
Određena zapremina rastvora uzorka uvodi se u kolonu pomoću automatskog unošenja uzorka ili ručno u precizno određenoj zoni. Prebrzo povlačenje ili pritiskanje klipa šprica, ukoliko se vrši ručno, može dovesti do promena u ispitivanoj raspodeli molekulske mase. Sistem za uvođenje rastvarača treba, u najvećoj mogućoj meri, da bude oslobođen od pulsiranja, ako je moguće tako što će sadržati pulsni prigušivač. Brzina protoka treba da bude u okviru 1 ml/min.

**1.6.6. Kolona**

U zavisnosti od uzorka, određivanje polimera vrši se upotrebom ili jedne kolone ili više međusobno povezanih kolona u nizu. Komercijalno su dostupni brojni porozni materijali za kolone sa definisanim svojstvima (npr. veličina pora, ekskluzioni limit (gornja granica molekulske mase iznad koje će se molekuli eluirati u retencionoj zapremini)) Izbor gela za razdvajanje ili dužina kolone zavise od svojstava uzorka (hidrodinamičke zapremine, raspodele molekulske mase) i od specifičnih uslova za razdvajanje kao što su rastvarač, temperatura i brzina protoka**1,2,3**.

**1.6.7. Teorijski podovi**

Za kolonu ili kombinaciju kolona koje se koriste za razdvajanje određuje se broj teorijskih podova. To podrazumeva, u slučaju primene THF kao rastvarača, nanošenje rastvora etil-benzena ili neke druge odgovarajuće nepolarne supstance na kolonu poznate dužine. Broj teorijskih podova određuje se pomoću jednačine:



pri čemu:

*N* jeste broj teorijskih podova;

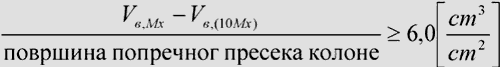
*V*e jeste eluciona zapremina na maksimumu pika;

*W* jeste širina pika na baznoj liniji;

*W*1/2 jeste širina pika na polovini visine.

**1.6.8. Efikasnost razdvajanja**

Pored broja teorijskih podova koji kvantitativno određuje širinu traka, važnu ulogu ima efikasnost razdvajanja koja je određena nagibom kalibracione krive. Efikasnost razdvajanja kolone dobija se na osnovu odnosa:

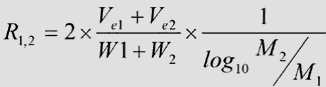


pri čemu:

*V*e.Mx jeste eluciona zapremina polistirena molekulske mase Mx;

*V*e(10Mx) jeste eluciona zapremina polistirena sa deset puta većom molekulskom masom.

Rezolucija sistema definiše se kao:



pri čemu:

*V*e1 i *V*e2 jesu elucione zapremine dva polistirenska standarda na maksimumu pika;

*W*1 i *W*2 jesu širine pikova na baznoj liniji;

*M*1 i *M*2 jesu molekulske mase na maksimumu pika (treba da se razlikuju za faktor 10).

R-vrednost za sistem kolona treba da bude veća od 1,7**4**.

**1.6.9. Rastvarači**

Svi rastvarači treba da budu visoke čistoće (koristi se THF čistoće 99,5%). Posuda za rastvarač (ukoliko je neophodno u atmosferi inertnog gasa) treba da bude dovoljna za kalibraciju kolone i nekoliko analiza uzorka.

Rastvarač se degazira pre nego što se ubaci u kolonu uz pomoć pumpe.

**1.6.10. Kontrola temperature**

Temperatura kritičnih unutrašnjih delova (petlje za injektovanje, kolone, detektor i cevi) treba da bude konstantna i u skladu sa izabranim rastvaračem.

**1.6.11. Detektor**

Svrha detektora je da beleži koncentraciju uzorka eluiranog sa kolone. Da bi se izbeglo nepotrebno širenje pikova, zapremina kivete ćelije detektora treba da bude što je moguće manja. Ona ne sme da bude veća od 10 ml osim u slučaju detektora zasnovanih na rasipanju svetlosti i viskoznosti. Za detekciju se najčešće koristi diferencijalna refraktometrija. Ukoliko uzorak ili rastvarač imaju neka posebna svojstva, mogu se koristiti i drugi tipovi detektora, npr. UV/VIS, IC, detektori viskoznosti i dr.

**2. PODACI**

Standard SRPS ISO 13885**1** služi kao literatura za detalje o kriterijumima za procenu kao i u vezi zahteva koji se odnose na prikupljanje i obradu podataka.

Za svaki uzorak se vrše dva nezavisna eksperimenta. Oni se odvojeno analiziraju. U svim slučajevima važno je izvršiti ispitivanje slepe probe pod istim uslovima kao i uzorak.

Neophodno je jasno naznačiti da su izmerene vrednosti relativne vrednosti ekvivalentne molekulskim masama korišćenih standarda.

Nakon što se odrede retencione zapremine ili retenciona vremena (mogu se korigovati pomoću internih standarda) na grafik se ucrtavaju ove vrednosti prema logaritmu Mp vrednosti (pri čemu je Mp maksimum pika kalibracionog standarda). Potrebne su najmanje dve kalibracione tačke u dekadnom opsegu molekulskih masa (1 kD-10 kD, 10 kD-100 kD, 100 kD-1.000 kD) i najmanje pet mernih tačaka za ceo grafik koje pokrivaju raspon očekivanih molekulskih masa. Završna tačka malih molekulskih masa koja se nalazi na kraju kalibracione krive definiše se pomoću *n*-heksilbenzena ili nekog drugog odgovarajućeg nepolarnog rastvarača. Deo krive koji odgovara molekulskim masama ispod 1.000 kD određuje se i koriguje ako je potrebno zbog sadržaja nečistoća i aditiva. Podaci sa krive eluiranja uglavnom se obrađuju elektronski, ali se mogu vršiti i ručna izračunavanja**XXVII**. Ukoliko se u koloni zadržao neki od nerastvornih polimera, njegova molekulska masa je verovatno veća od one koju ima rastvorna frakcija, i ukoliko se zanemari može doći do loše procene sadržaja molekula sa malim molekulskim masama.

Uputstvo za korigovanje sadržaja molekula sa malim molekulskim masama kod nerastvornih polimera dato je u Delu drugom ove metode.

Kriva raspodele se daje u obliku tabele ili slike (diferencijalna frekvencija ili zbir iznosa u procentima prema vrednosti log M). Kod grafičkog prikaza jedan dekadni opseg molekulskih masa treba da bude širine oko 4 cm, a maksimalna visina pika da iznosi 8 cm. U slučaju integraljenja krive raspodele razmak ordinate između 0% i 100% treba da bude oko 10 cm.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXVII** Koristi se ASTM D 3536-91

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

2.2.1. Ispitivanoj supstanci:

- poznate podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće);

- opis obrade uzorka, zapažanja problemi.

2.2.2. Instrumentima:

- posuda za rastvarač, inertni gas, degaziranje eluenta, sastav eluenta, nečistoće;

- pumpa, pulsni prigušivač, sistem za injektovanje;

- hromatografske kolone (proizvođač, informacije o karakteristikama kolona, kao što su veličina pora, vrsta materijala za odvajanje itd., broj, dužina i redosled upotrebljenih kolona);

- broj teorijskih podova kolone (ili kombinacije), efikasnost razdvajanja (rezolucija sistema),

- podatke o simetriji pikova;

- temperatura kolona, način kontrole temperature;

- detektor (princip merenja, vrsta, zapremina kivete);

- merač protoka ukoliko je korišćen (proizvođač, princip merenja);

- sistem za prikupljanje i obradu podataka (hardver i softver).

2.2.3. Kalibraciji sistema:

- detaljan opis metode korišćene u izradi kalibracione krive;

- podatke o kriterijumima kvaliteta koji se odnose na ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, greška metodom najmanjih kvadrata, itd.);

- podatke o svim primenjenim ekstrapolacijama, pretpostavkama i aproksomacijama prilikom ispitivanja, proceni i obradi podataka;

- sva merenja korišćena pri izradi kalibracione krive se dokumentuju u vidu tabele koja sadrži sledeće podatke za svaku kalibracionu tačku:

(-) ime uzorka;

(-) ime proizvođača uzorka;

(-) karakteristične vrednosti standarda Mp, Mn, Mw, Mw/Mn, onako kako ih je dostavio proizvođač ili koje su izvedene na osnovu dodatnih merenja zajedno sa detaljima o metodi njihovog određivanja;

(-) injektovana zapremina i injektovana koncentracija uzorka;

(-) Mp vrednost koja je korišćena za kalibraciju;

(-) eluciona zapremina ili korigovano retenciono vreme izmereno na maksimumu pika;

(-) Mp izračunato na maksimumu pika;

(-) procentualna greška izračunate vrednosti Mp i kalibrisane vrednosti.

2.2.4. Sadržaju molekula sa malim molekulskim masama:

- opis korišćene metode i način na koji su izvršeni eksperimenti;

- podatke o procentu molekula sa malim molekulskim masama (m/m) u odnosu na ceo uzorak;

- podatke o nečistoćama, aditivima i drugim vrstama koje nisu polimeri izražene kao maseni procenat u odnosu na ceo uzorak.

2.2.5. Proceni:

- procena na osnovu retencionog vremena: sve metode koje obezbeđuju zahtevanu reproduktivnost (metoda korekcije, interni standardi i dr.);

- podatak o tome da li je procena izvršena na osnovu elucione zapremine ili na osnovu retencionog vremena;

- podatke o ograničenjima procene ako pikovi nisu potpuno analizirani;

- opis metode poravnavanja, ukoliko su korišćene;

- priprema i prethodna obrada uzorka;

- prisustvo nerastvornih čestica, ukoliko ih ima;

- injektovana zapremina (m1) i koncentracija injektovanog uzorka (mg/ml);

- zapažanja koja se odnose na uticaje koji dovode do odstupanja od idealnog profila gel propusne hromatografije;

- detaljan opis svih izmena postupka ispitivanja;

- detalje o opsezima greške;

- druge podatke i zapažanja relevantne za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. SRPS ISO 13885-1:2011, Punioci za boje i lakove - Gel propustljiva hromatografija - Deo I: tetrahidrofuran kao eluent

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

**Deo drugi**

**UPUTSTVO ZA KORIGOVANJE SADRŽAJA MOLEKULA SA MALIM MOLEKULSKIM MASAMA ZBOG PRISUSTVA NERASTVORNIH POLIMERA**

Kada je u uzorku prisutan nerastvorni polimer dolazi do gubitka mase u toku GPC analize. Nerastvorni polimer ireverzibilno se zadržava na koloni ili filteru dok njegov rastvorni deo prolazi kroz kolonu. U slučaju kada se može izmeriti ili pretpostaviti povećanje indeksa refrakcije (dn/dc) polimera, moguće je proceniti gubitak mase uzorka na koloni. U tom slučaju vrši se korekcija korišćenjem eksterne kalibracije sa standardnim materijalima poznate koncentracije i dn/dc da bi se kalibrisao odgovor refraktometra. U primeru koji sledi korišćen je standard poli(metil-metakrilata) (pMMA).

Kod eksterne kalibracije u analizi akrilnih polimera, pMMA standard poznate koncentracije u tetrahidrofuranu analizira se gel propusnom hromatografijom, a dobijeni rezultati koriste se za izračunavanje konstante refraktometra na osnovu jednačine:

K = R/(C x V x dn/dc)

pri čemu:

K jeste konstantna refraktometra (u mikrovoltima / sekund/ml);

R jeste odgovor pMMA standarda/ (u mikrovoltima / sekund);

C jeste koncentracija pMMA standarda (u mg/ml);

V jeste injektovana zapreminu (u ml);

dn/dc jeste uvećanje indeksa refrakcije za pMMA u tetrahidrofuranu (u ml/mg).

Za pMMA standard tipične vrednosti su:

R = 2 937 891

C = 1.07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9 x 10-5 ml /mg

Na ovaj način dobijena vrednost K, 3.05 x 1011 koristi se da se izračuna teorijski odgovor detektora ukoliko je 100% injektovanog polimera izdvojeno preko detektora.

**A.20. PONAŠANJE POLIMERA U VODI (RASTVORLJIVOST/EKSTRAKTIVNOST)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na revidiranoj verziji Uputstva za ispitivanje OECD 120 (1997). Detaljnije tehničke informacije date su u literaturi**1**.

*1.1. UVOD*

Za pojedine polimere, kao što su emulzioni polimeri, da bi se koristila ova metoda potrebna je prethodna priprema. Metoda se ne primenjuje na tečne polimere niti na polimere koji reaguju sa vodom pri uslovima ispitivanja.

Kada ispitivanje ovom metodom nije moguće ili nije praktično za izvođenje, ponašanje rastvorljivosti/ekstraktivnosti ispituje se drugim metodama. U takvim slučajevima navode se svi detalji i razlozi korišćenja tih metoda.

*1.2. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ponašanje polimera u vodenoj sredini rastvorljivost/ekstraktivnost određuje se primenom metode staklenog suda (videti metodu A.6. Rastvorljivost u vodi, metoda staklenog suda, koja je data u ovom prilogu) sa izmenama koje su date u ovoj metodi.

*1.4. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Oprema**

Za ovu metodu neophodno je:

- uređaj za mlevenje, tj. mlin za proizvodnju čestica poznatih veličina;

- aparat za mešanje sa mogućnošću kontrolisanja temperature;

- membranski sistem za filtriranje;

- odgovarajuća analitička oprema;

- standardizovana sita.

**1.5.2. Priprema uzorka**

Reprezentativni uzorak se prvo pomoću odgovarajućih sita svede na čestice veličine od 0,125 mm do 0,25 mm. Nekada je potrebno ohladiti uzorak zbog njegove stabilnosti ili procesa mlevenja. Gumasti materijali mogu se usitniti na temperaturi tečnog azota**1**.

Ako nije moguće dobiti čestice traženih veličina, materijal se usitnjava što je više moguće, a postignut rezultat navodi se u izveštaju. U izveštaju se navodi način na koji je samleveni uzorak čuvan pre ispitivanja.

**1.5.3. Postupak ispitivanja**

Tri uzorka po 10 g supstance koja se ispituje odmeri se u svaku od tri posude sa staklenim zapušačima i doda 1.000 ml vode u svaku posudu. Ako se količina od 10 g polimera pokaže nepodesnom, koristi se sledeća najveća količina sa kojom se može raditi. Količinu vode prilagođava se u skladu sa tim.

Posude se čvrsto zapuše i zatim mućkaju na 20° C. Koriste se uređaji za mućkanje ili mešanje koji mogu da rade na konstantnoj temperaturi. Nakon 24 časa, sadržaj svake posude se centrifugira ili filtrira, a koncentracija polimera u bistrom vodenom sloju određuje se odgovarajućom analitičkom metodom.

Ako ne postoje odgovarajuće analitičke metode za određivanje polimera u vodenoj fazi, ukupna rastvorljivost - ekstraktivnost procenjuje se iz mase osušenog taloga sa filtera ili osušenog taloga dobijenog centrifugiranjem.

Najčešće je potrebno da se napravi kvantitativna razlika između nečistoća i aditiva sa jedne strane, i polimera sa malim molekulskim masama sa druge strane. U slučaju gravimetrijskog određivanja važno je ispitati slepu probu u kojoj ispitivana supstanca nije prisutna, kako bi se izračunao talog koji nastaje u eksperimentalnom postupku.

Rastvorljivost/ekstraktivnost - ponašanje polimera u vodi na 37° C na pH 2 i pH 9 određuje se na isti način kao što je opisano za eksperiment na 20° C. pH vrednosti postižu se dodavanjem ili odgovarajućih pufera, ili odgovarajućih kiselina ili baza kao što su hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina, natrijum ili kalijum hidroksid analitičke čistoće ili NH3.

U zavisnosti od primenjene metode analize, vrši se jedno ili dva ispitivanja. Kada postoji dovoljno specifičnih metoda za direktnu analizu polimera u vodenoj fazi, dovoljno je jedno ispitivanje. Kada navedene metode ne postoje i kada je određivanje ponašanja polimera rastvorljivosti/ekstraktivnosti ograničeno na indirektne analize kojima se određuje samo ukupni sadržaj organskog ugljenika (Total organic carbon, u daljem tekstu: TOC) vodenog ekstrakta, vrše se i dodatna ispitivanja. Dodatno ispitivanje se vrši na tri uzorka, koristeći deset puta manje količine uzorka polimera i iste količine vode kao u prvom ispitivanju.

**1.5.4. Analiza**

*1.5.4.1. Ispitivanje izvršeno sa jednom količinom uzorka*

Postoje metode za direktnu analizu komponenti polimera u vodenom ekstraktu. Alternativno se razmatra indirektna analiza rastvorenih/ekstrahovanih komponenti polimera određivanjem ukupnog sadržaja rastvornih komponenti korigovanog za nepolimerne komponente.

Analiza ukupnog sadržaja polimernih vrsta u vodenom ekstraktu izvodi se:

1) ili dovoljno osetljivom metodom odnosno:

- TOC koristeći digestiju persulfatom ili dihromatom za prevođenje u CO2 koji se određuje infracrvenom spektrometrijom (u daljem tekstu: IR) ili hemijskom analizom;

- Atomska apsorpciona spektrometrija (u daljem tekstu: AAS) ili induktivno kuplovana plazma (u daljem tekstu: ICP), emisioni ekvivalent za polimere koji sadrže metale ili silicijum;

- UV apsorpcija ili spektrofluorimetrija za aril-polimere;

- LC-MS za uzorke male molekulske mase;

2) ili isparavanjem u vakuumu do suvog vodenog ekstrakta i spektroskopskom (IR, UV itd.) ili AAS/ICP analizom taloga.

Ako se analiza vodenog ekstrakta kao takva ne može primeniti, vodeni ekstrakt se ekstrahuje organskim rastvaračem koji se ne meša sa vodom, tj. hlorovanim ugljovodonikom. Rastvarač se zatim upari i talog analizira kako je opisano da bi se odredio sadržaj polimera. Svaka komponenta u ovom talogu koja je identifikovana kao nečistoća ili aditiv oduzima se u cilju određivanja stepena rastvorljivosti/ekstraktivnosti samog polimera.

Kada su prisutne relativno velike količine takvog materijala talog se analizira npr. HPLC ili GC analizom da bi se razlikovale nečistoće od monomera i prisutnih vrsta nastalih od monomera, tako da se odredi pravi sadržaj onoga što je nastalo.

U nekim slučajevima je dovoljno jednostavno isparavanje organskog rastvarača do suvog i merenje suvog ostatka.

*1.5.4.2. Ispitivanje izvršeno sa dve različite količine uzorka*

Svi ekstrakti taloga analiziraju se na TOC.

Nerastvorni/neekstrahovani deo uzorka određuje se gravimetrijski. Ukoliko, nakon centrifugiranja ili filtriranja sadržaja svake posude, talog polimera ostane zalepljen za zid posude, posuda se ispira filtratom sve dok se ne prebaci sav talog. Nakon toga, filtrat se opet centrifugira ili filtrira. Talog koji ostane na filteru ili u kiveti centrifuge suši se na 40°C u vakuumu i meri se. Sušenje se nastavlja do konstantne mase.

**2. PODACI**

*2.1. ISPITIVANJE JEDNE KOLIČINE UZORKA*

Navode se pojedinačni rezultati za svaku od tri boce i njihova srednja vrednost izražena u jedinicama mase po zapremini rastvora (uobičajeno mg/L) ili jedinicama mase po masi uzorka polimera (uobičajeno mg/g).

Navodi se i gubitak mase uzorka (izračunat kao masa rastvorene supstance podeljena sa masom početnog uzorka). Računaju se relativne standardne devijacije (RSD). Navode se pojedinačne cifre za ukupnu supstancu (polimer + glavni aditivi itd.) i samo za polimer (tj. nakon oduzimanja doprinosa aditiva).

*2.2. ISPITIVANJE DVE RAZLIČITE KOLIČINE UZORKA*

Pojedinačne TOC vrednosti vodenih ekstrakta iz dva eksperimenta pri kojima su vršena po tri ispitivanja i srednja vrednost za svaki eksperiment, izražavaju se kao jedinice mase po zapremini rastvora (uobičajeno mgC/L), kao i u jedinicama mase po masi početnog uzorka (uobičajeno mgC/g).

Ukoliko ne postoji razlika između rezultata dobijenih sa većim i manjim odnosom voda/uzorak, ovo može da ukazuje na to da su sve komponente koje mogu da se ekstrahuju zaista i bile ekstrahovane. U tom slučaju, direktna analiza nije potrebna.

Navode se pojedinačne mase taloga i izražavaju u procentima od početnih masa uzorka. Srednje vrednosti računaju se za svaki eksperiment. Razlike između 100% i nađenih procenata predstavljaju procenat rastvornog materijala i materijala koji se ekstrahuje u originalnom uzorku.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

3.1.1. Supstanci koja se ispituje:

- dostupne podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće, sadržaj molekula malih molekulskih masa).

3.1.2. Eksperimentalnim uslovima:

- opis postupaka i eksperimentalnih uslova;

- opis analitičkih metoda i metoda detekcije.

3.1.3. Rezultatima:

- rezultati rastvorljivosti/ekstraktivnosti u mg/l; pojedinačne i srednje vrednosti ekstrahovanja različitim rastvaračima, razdvojene na sadržaj polimera i nečistoća, aditiva, itd;

- rezultati rastvorljivosti/ekstraktivnosti u mg/g polimera;

- TOC vrednosti vodenih ekstrakta, mase rastvorene supstance i izračunate procente, ako su merene;

- pH svakog uzorka;

- podatke o vrednostima slepih proba;

- kada je potrebno, napomene o hemijskoj nestabilnosti ispitivane supstance, tokom postupka ispitivanja i analitičkog postupka;

- sve podatke koji su važni za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke

**A.21. OKSIDUJUĆA SVOJSTVA (ZA TEČNOSTI)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ova metoda osmišljena je za merenje potencijala tečnih supstanci da povećaju i razviju brzinu ili intenzitet gorenja zapaljivih supstanci, ili da naprave smešu sa zapaljivom supstancom koja ima sposobnost spontanog paljenja, kada se ovakva smeša dobro izmeša. Zasniva se na UN metodi ispitivanja tečnosti sa oksidujućim svojstvima**1**. Metoda A.21. osmišljena je tako da pre svega ispunjava zahteve Uredbe Evropskog parlamenta i Saveta (EZ) broj 1907/2006, pa je potrebno izvršiti poređenje sa jednom referentnom supstancom. Ispitivanje i poređenje sa dodatnim referentnim supstancama je potrebno u slučaju kada se očekuje da će rezultati ispitivanja biti korišćeni u druge svrhe**XXVIII**.

Ispitivanje se ne mora vršiti kada je na osnovu strukturne formule pouzdano jasno da supstanca nema sposobnost da egzotermno reaguje sa zapaljivim materijalom.

Pre nego što se pristupi ispitivanju korisno je imati preliminarne podatke o potencijalnim eksplozivnim svojstvima supstance.

Ovo ispitivanje se ne primenjuje na supstance u čvrstom stanju, gasove, eksplozive ili visoko zapaljive supstance ili organske perokside.

Kada postoje rezultati za ispitivanu supstancu u UN metodama ispitivanja za oksidujuće tečnosti**1** nije neophodno izvršiti njeno ispitivanje.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXVIII***Kao na primer u okviru propisa UN o transportu.*

*1.2. DEFINICIJE*

Vreme porasta pritiska jeste prosečna vrednost izmerenog vremena koje je potrebno da se pritisak smeše koja se ispituje podigne sa 690 kPa na 2.070 kPa iznad atmosferskog pritiska.

*1.3. REFERENTNA SUPSTANCA*

Kao referentna supstanca koristi se 65% (m/m) vodeni rastvor azotne kiseline (analitičke čistoće)**XXIX**.

Ukoliko lice koje vrši ispitivanje smatra da se rezultati ovog ispitivanja mogu koristiti i u neke druge svrhe**1**, postoji mogućnost da se ispitaju i dodatne referentne supstance**XXX**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXIX** Kiselina se titruje pre ispitivanja kako bi se potvrdila njena koncentracija.  
**XXX** Npr: 50% (m/m) perhlorna kiselina i 40% (m/m) natrijum-hlorat se koriste u literaturi**1**.

*1.4. PRINCIP METODE*

Tečnost koja se ispituje meša se u masenom odnosu jedan prema jedan sa vlaknastom celulozom i stavlja se u sud pod pritiskom. Ukoliko tokom mešanja ili punjenja posude dođe do spontanog paljenja, nije potrebno dalje ispitivanje.

Ukoliko ne dođe do spontanog paljenja sprovodi se kompletno ispitivanje. Smeša se zagreva u posudi pod pritiskom i određuje se vreme koje je potrebno da se pritisak poveća sa 690 kPa na 2.070 kPa (iznad atmosferskog pritiska). Ova vrednost se upoređuje sa prosečnom vrednošću vremena porasta pritiska referentne supstance u smeši sa celulozom u odnosu 1:1.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

U seriji od pet ispitivanja jedne supstance rezultati pojedinačnih ispitivanja ne treba da odstupaju za više od 30% u odnosu na aritmetičku srednju vrednost. Rezultati koji odstupaju više od 30% od srednje vrednosti odbacuju se, poboljšava se postupak mešanja supstanci i punjenja posude za ispitivanje i zatim se ispitivanje ponavlja.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

*1.6.1.1. Zapaljive supstance*

Osušena vlaknasta celuloza sa vlaknima dužine između 50 µm i 250 µm i srednjim prečnikom od 25 µm**XXXI** koristi se kao zapaljivi materijal. Celuloza se suši do konstantne mase u sloju čija debljina ne prelazi 25 mm na temperaturi od 105° C tokom 4 sata i drži se u eksikatoru bez sredstva za sušenje dok se ne ohladi i dalje do ispitivanja. Sadržaj vode u osušenoj celulozi ne treba da bude veći od 0,5% po jedinici suve mase**XXXII**. Ukoliko je potrebno, vreme sušenja se produžava**XXXIII**. Ista šarža celuloze koristi se u toku celog ispitivanja.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXI** Npr. Vatman kolonska hromatografija celulozni prah CF 11, kataloški broj 4021 050  
**XXXII** Potvrđena npr. Karl-Fišerovom titracijom  
**XXXIII** Ovaj sadržaj vode se postiže i npr. zagrevanjem na 105°C u vakumu 24 časa.

*1.6.1.2. Oprema*

1.6.1.2.1. Sud pod pritiskom

Zahteva se korišćenje suda pod pritiskom. Ovaj sud se sastoji od cilindričnog tela izrađenog od čelika, dužine 89 mm i spoljnog prečnika od 60 mm (videti Sliku 1). Dve suprotne strane mašinski su obrađene (čime se poprečni presek posude smanjuje na 50 mm) da bi se olakšalo navijanje zapušača na kome se nalazi sistem za paljenje i ventil oduška. Sud, koji ima šupljinu prečnika 20 mm, iznutra se svodi na dubinu od 19 mm i narezuje se da primi 1" po Britanskom standardnom sistemu ili veličinu ekvivalentnu ovoj prema metričkom sistemu. Ventil za odušak, u obliku ručke koja se montira na bočnu stranu aparata, zavrne se za krivu površinu suda pod pritiskom na udaljenosti od 35 mm od jednog od njegovih krajeva i pod uglom od 90° u odnosu na prirubnice. Izdubi se otvor dubine 12 mm i nareže tako da primi veličinu od 1/2" po Britanskom standardnom sistemu (ili veličinu ekvivalentu ovoj prema metričkom sistemu) na kraju bočne strane. Po potrebi koristi se inertni zaptivač kako bi sud bio nepropustan za gasove. Ručka koja se nalazi sa strane proteže se 55 mm od tela suda pod pritiskom i ima navoj od 6 mm. Kraj ove ručke ima navoj koji omogućava da u njega stane pretvarač pritiska sa dijafragmom. Koristi se bilo koji uređaj za merenje pritiska ako nije u kontaktu sa vrelim gasovima ili proizvodima razlaganja i ako može da izdrži porast pritiska od 690 kPa do 2.070 kPa u vremenu koje nije veće od 5 ms.

Kraj suda pod pritiskom koji je na većoj udaljenosti od ove ručke zatvara se zapušačem na kome se nalazi sistem za paljenje opremljen sa dve elektrode, od kojih je jedna izolovana u odnosu na telo zaptivača a druga uzemljena na njega. Drugi kraj suda pod pritiskom zatvara se sigurnosnim diskom koji štiti od eksplozije (pritisak eksplozije oko 2.200 kPa) koji je pričvršćen poklopcem za zaptivanje sa otvorom od 20 mm. Ako je potrebno koristi se inertni zaptivač kako bi sud bio nepropustan za gasove. Stalak (viseti Sliku 2) drži aparaturu u odgovarajućem položaju u toku upotrebe. Sastoji se od osnove izrađene od mekog čelika dimenzija 235 mm x 184 mm x 6 mm i šupljeg četvrtastog profila dužine 185 mm i dimenzija 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Sa jedne strane četvrtastog profila izrežu se po dužini dve suprotne stranice tako da se dobije konstrukcija sa dve noge ravnih stranica sa visinom kućišta od 86 mm. Krajevi ovih nogu ravnih stranica seku se pod uglom od 60° po horizontalnoj ravni da bi se zavarili za oslonac. Žleb širine 22 mm i dubine 46 mm montira se na jednu stranu kućišta suda tako da kada se sud spusti na oslonac zapušač na kome se nalazi sistem za paljenje bude okrenut prema izolatorskoj kutiji, a ručka koja je montirana sa strane upada u ovaj žleb. Komad čelika širine 30 mm i debljine 6 mm vari se za donju unutrašnju stranu izolatorske kutije da bi održavao rastojanje. Dva šrafa od 7 mm koji se prišrafljuju sa suprotne strane drže sud pod pritiskom čvrsto na svom mestu. Dve trake od čelika širine 12 mm i debljine 6 mm zavarene sa donje strane gde se sastavni delovi dodiruju sa izolatorskom kutijom, obezbeđuju sud pod pritiskom odozdo.

1.6.1.2.2. Sistem za paljenje

Sistem za paljenje sastoji se od žičanog provodnika dužine 25 cm izrađenog od Ni/Cr, čiji je prečnik 0,6 mm i otpornost 3,85 Ω/m. Žica je navijena na šipku prečnika 5 mm, u obliku kalema i pričvršćena je za elektrode zapušača na kome se nalazi sistem za paljenje. Ovaj kalem ima jedan od oblika koji su prikazani na Slici 3. Razmak između dna suda i donje strane provodnika pomoću koga se pali smeša je 20 mm. Ukoliko se elektrode ne mogu podešavati, krajevi provodnika pomoću koga se pali smeša i dna posude treba da budu izolovani keramičkom oblogom. Provodnik se zagreva stalnim izvorom struje od najmanje 10 A.

**1.6.2. Postupak ispitivanjaXXXIV**

Aparatura, spojena sa pretvaračem pritiska i sistemom za paljenje, ali bez sigurnosnog diska koji štiti od eksplozije, nalazi se na podlozi pri čemu je zapušač sa sistemom za paljenje u donjoj poziciji. U staklenoj čaši se pomeša 2,5 g tečnosti koja se ispituje sa 2,5 g osušene celuloze pomoću staklenog štapića**XXXV**. Iz bezbednosnih razloga, prilikom mešanja lice koje rukuje smešom se štiti sigurnosnim štitom. Ukoliko smeša počne da gori tokom mešanja ili stavljanja u posudu za ispitivanje, ispitivanje se ne mora sprovesti do kraja. Smeša se dodaje u malim količinama u sud pod pritiskom uz sabijanje. Vodi se računa da smeša bude postavljena oko provodnika pomoću koga se vrši paljenje smeše i da kontakt između smeše i provodnika bude dobar. Važno je da se provodnik ne iskrivi tokom procesa nanošenja smeše jer to može dovesti do pogrešnih rezultata**XXXVI**. Sigurnosni disk koji štiti od eksplozije stavlja se u odgovarajuću poziciju i pričvršćuje poklopcem za zaptivanje. Napunjen sud postavlja se na stalak tako da se sigurnosni disk koji štiti od eksplozije nalazi na vrhu, a aparat se postavlja u digestor ili u jedinicu za ispitivanje zapaljivih materija. Izvor struje pričvrsti se za spoljne kleme zapušača sa sistemom za paljenje i pusti se struja jačine 10 A. Vreme između pripreme smeše za ispitivanje i uključivanja struje ne treba da bude duže od 10 minuta.

Signal koji dolazi sa pretvarača pritiska beleži odgovarajući sistem koji istovremeno beleži podatke o razvoju pritiska tokom vremena i analizira ih (npr. program za beleženje podataka dobijenih tokom ispitivanja povezan sa programom za izradu grafikona). Smeša se zagreva sve dok ne pukne sigurnosni disk koji štiti od eksplozije ili najmanje 60 s. Ukoliko se sigurnosni disk koji štiti od eksplozije ne rasprsne, smeša se ostavlja da se ohladi pre nego što se aparat pažljivo rastavi, vodeći računa da može doći do pojave nadpritiska. Izvodi se po pet ispitivanja sa supstancom koja se ispituje i sa supstancom koja služi kao referentna supstanca. Beleži se vreme koje je potrebno da pritisak od 690 kPa poraste do pritiska od 2.070 kPa. Izračunava se srednja vrednost vremena koje protekne do porasta pritiska.

Može se dogoditi da supstanca dovodi do porasta pritiska (prebrzo ili presporo) usled hemijskih reakcija koje nisu karakteristične za oksidujuća svojstva. Tada može biti potrebno da se ponovi ispitivanje sa nekom inertnom supstancom, npr dijatomejskom zemljom, umesto sa celulozom, kako bi se utvrdila priroda reakcije.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXIV** Smeše oksidujućih supstanci sa celulozom potencijalno su eksplozivne i sa njima se pažljivo rukuje.  
**XXXV** U praksi se postiže pripremanjem smeše tečnosti koja se ispituje i celuloze u odnosu 1:1 u većoj količini od one koja je potrebna za ispitivanje i prebacivanjem 5 ± 0,1 g u posudu pod pritiskom. Smeša se sveže priprema za svako ispitivanje.  
**XXXVI** Kontakt između susednih namotaja se izbegava.

**2. PODACI**

Vremena porasta pritiska ispitivane supstance i referentnih supstanci.

Vremena porasta pritiska inertne supstance ukoliko je takvo ispitivanje sprovedeno.

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Izračunava se prosečno vreme porasta pritiska za ispitivanu supstancu i za referentne supstance.

Izračunava se i prosečno vreme porasta pritiska za inertnu supstancu (ukoliko su ispitivanja izvršena).

Primeri rezultata dati su u Tabeli 1.

Tabela 1.

Primeri rezultata**(a)**

|  |  |
| --- | --- |
| Supstanca(b) | Prosečno vreme porasta pritiska za smešu sa celulozom 1:1 (ms) |
| Amonijum-dihromat, zasićeni vodeni rastvor | 20 800 |
| Kalcijum-nitrat, zasićeni vodeni rastvor | 6 700 |
| Feri-nitrat, zasićeni vodeni rastvor | 4 133 |
| Litijum-perhlorat, zasićeni vodeni rastvor | 1 686 |
| Magnezijum-perhlorat, zasićeni vodeni rastvor | 777 |
| Nikal-nitrat, zasićeni vodeni rastvor | 6 250 |
| Azotna kiselina, 65% | 4 767(c) |
| Perhlorna kiselina, 50% | 121(c) |
| Perhlorna kiselina, 55% | 59 |
| Kalijum nitrat, 30% vodeni rastvor | 26 690 |
| Srebro-nitrat, zasićeni vodeni rastvor | (d) |
| Natrijum-hlorat, 40% vodeni rastvor | 2 555(c) |
| Natrijum-nitrat, 45% vodeni rastvor | 4 133 |
| Inertna supstanca |  |
| Voda: celuloza | (d) |

(a) Videti u literaturi1 za klasifikaciju prema transportnoj šemi UN.  
(b) Zasićeni rastvori treba da budu pripremljeni na 20° C.  
(c) Srednja vrednost iz međulaboratorijskih uporednih ispitivanja.  
(d) Maksimalni pritisak od 2070 kPa nije dostignut.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- identitetu, sastavu, čistoći itd. podatke o supstanci koja se ispituje;

- koncentraciji ispitivane supstance;

- postupku sušenja celuloze koja je korišćena pri ispitivanju;

- sadržaju vode u celulozi koja je korišćena pri ispitivanju;

- rezultatima merenja;

- rezultatima ispitivanja sa inertnom supstancom, ako postoje;

- izračunatom prosečnom vremenu porasta pritiska;

- odstupanju od standardnog postupka ispitivanja i razloge za to;

- svim dodatnim informacijama i primedbama značajnim za tumačenje rezultata.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA****XXXVII***

Rezultati ispitivanja procenjuju se na osnovu:

a) činjenice da li se smeša ispitivane supstance i celuloze spontano pali i

b) poređenjem prosečnih vremena porasta pritiska sa vrednosti 690 kPa na pritisak od 2.070 kPa ispitivane supstance i referentnih supstanci.

Tečna supstanca smatra se oksidujućom supstancom ukoliko:

a) se smeša ispitivane supstance i celuloze u masenom odnosu 1:1 spontano pali ili

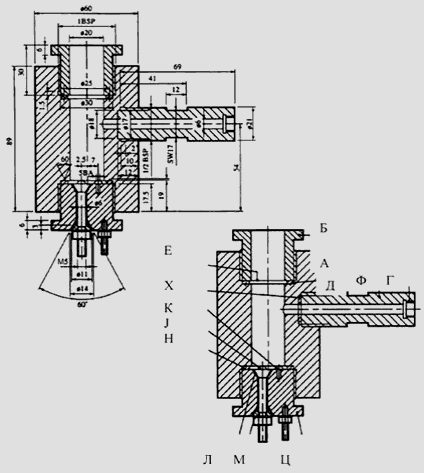
b) smeša ispitivane supstance i celuloze u masenom odnosu 1:1 ima prosečno vreme povećanja pritiska manje ili jednako smeši vodenog rastvora azotne kiseline 65% (m/m) i celuloze u masenom odnosu 1:1.

Da bi se izbegao lažni pozitivni rezultat, prilikom analize dobijenih rezultata uzima se u razmatranje i ispitivanje sa inertnim materijalom.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXVII** Videti u literaturi1 za tumačenje rezultata koji su u okviru UN propisa o transportu za korišćenje nekoliko referentnih supstanci

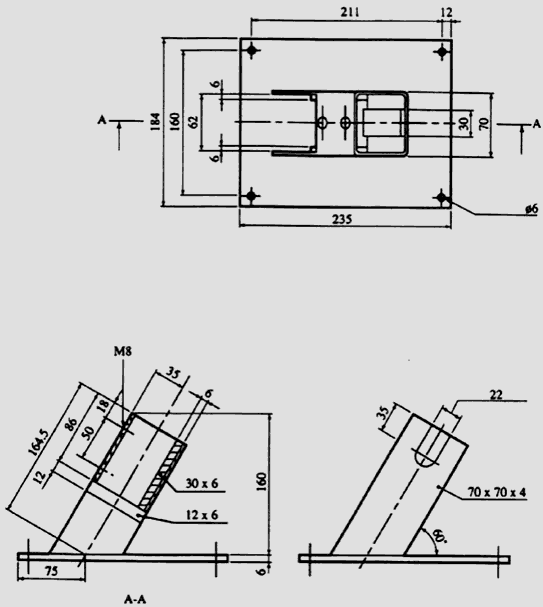
*4. LITERATURA*

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd evised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, str. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

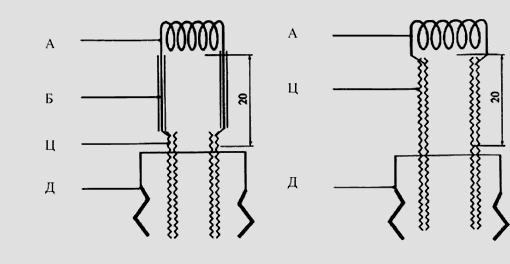


Pri čemu je:  
A - Telo suda pod pritiskom;  
B - Zadržni ventil diska koji štiti od eksplozije;  
C - Zadržni ventil za vatru;  
D - Zaptivač od mekog olova;  
E - Disk koji štiti od eksplozije;  
F - Ručka;  
G - Glava prenosnika pritiska;  
H - Zaptivač;  
J - Izolovana elektroda;  
K - Uzemljena elektroda;  
L - Izolacija;  
M - Čelična kupa;  
N - Iskrivljeni žleb zaptivača.

Slika 2. Oslonac



Slika 3. Sistem za paljenje



Pri čemu je:  
A - Kalem za paljenje;  
B - Izolacija;  
C - Elektrode;  
D - Zaptivač za vatru.

Napomena: Može se koristiti bilo koji od ovih sistema.

**A.22. ODREĐIVANJE SREDNJEG GEOMETRIJSKOG PREČNIKA VLAKANA POMOĆU DUŽINE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

U ovoj metodi opisuje se postupak za merenje srednjeg geometrijskog prečnika pomoću dužine (Length Weighted Geometric Mean Diameter, u daljem tekstu: LWGMD) veštačkih mineralnih vlakana (Man Made Mineral Fibres, u daljem tekstu: MMMF). Budući da se LWGMD vlakana sa 95% verovatnoće nalazi između nivoa pouzdanosti uzorka od 95% (tj. LWGMD ± dve standardne greške), vrednost koja se navodi u izveštaju (ispitivana vrednost) odgovaraće donjoj granici pouzdanosti uzorka od 95% (tj. LWGMD - 2 standardne greške). Ova metoda zasniva se na ažuriranoj verziji (jun 1994. godine) nacrta industrijskog postupka za zaštitu zdravlja, bezbednost i zaštitu životne sredine (Health, Safety & Environment, HSE) koji je dogovoren na sastanku između ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) i HSE u Česteru 26. septembra 1993. godine i koji je izrađen za potrebe drugog međulaboratorijskog eksperimenta i na osnovu tog eksperimenta**1,2**. Ova merna metoda može se koristiti za opisivanje prečnika vlakana supstanci u rasutom stanju ili proizvoda koji sadrže MMMF, uključujući vatrostalna keramička vlakna (refractory ceramic fibres, RCF), veštačka staklena vlakna (man-made vitreous fibres, MMVF), kristalna i polikristalna vlakna.

Određivanje dužinom je način da se kompenzuje uticaj na raspodelu prečnika zbog pucanja dugačkih vlakana prilikom uzorkovanja ili rukovanja materijalom. Za merenje raspodele veličina prečnika MMMF koristi se geometrijska statistika (geometrijska sredina) budući da se njihove raspodele veličina obično približavaju log-normalnoj raspodeli.

Merenje dužine i prečnika je zamoran i dugotrajan posao, ali ako se mere samo vlakna koja dodiruju beskonačno tanku crtu u vidnom polju skenirajućeg elektronskog mikroskopa (u daljem tekstu: SEM), tada je verovatnoća da se odabere određeno vlakno srazmerna dužini. Budući da je pitanje dužine za potrebe određivanja dužinom time rešeno, potrebno je samo izmeriti prečnik i LWGMD-2SE se tada može izračunati na način kako je opisano.

*1.2. DEFINICIJE*

Čestica jeste predmet čiji je odnos dužine i širine manji od 3:1.

Vlakno jeste predmet čiji je odnos dužine i širine (odnos stranica) najmanje 3:1.

*1.3. PODRUČJE PRIMENE I OGRANIČENJA*

Ova metoda namenjena je proučavanju raspodela prečnika kod srednjih prečnika od 0,5 μm do 6 μm. Veći prečnici mogu se meriti uz primenu manjih povećanja SEM, ali se time povećavaju ograničenja metoda kod finijih raspodela vlakana, dok se u slučaju srednjih prečnika ispod 0,5 μm preporučuje merenje uz pomoć transmisioni elektronski mikroskop (u daljem tekstu: TEM).

*1.4. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Uzme se određeni broj reprezentativnih uzoraka iz jezgra mekane ploče ili slobodnih vlakana u rasutom stanju. Vlakna u rasutom stanju se skrate drobljenjem i reprezentativni poduzorak disperguje u vodi. Alikvoti se ekstrahuju i filtriraju kroz polikarbonatni filter veličine pora 0,2 μm i pripreme za pregled pod skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Prečnici vlakana mere se pod uveličanjem x 10.000 ili većim metodom presecanja linija da bi se dobila nepristrasna procena srednjeg prečnika. Izračuna se donji interval pouzdanosti 95% (na osnovu jednostranog ispitivanja) tako da se dobije procena najniže vrednosti srednjeg geometrijskog prečnika vlakana materijala.

*1.5. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.5.1. Bezbednost/mere opreza**

Izlaganje ljudi vlaknima u vazduhu treba svesti na najmanju moguću meru i kod rukovanja suvim vlaknima koristiti digestor ili komoru za rukovanje sa rukavicama.

Izloženost ljudi treba periodično proveravati kako bi se utvrdila efektivnost kontrolnih metoda. Kod rukovanja MMMF vlaknima treba nositi rukavice za jednokratnu upotrebu kako bi se umanjila iritacija kože i sprečila unakrsna kontaminacija.

**1.5.2. Aparatura/oprema**

- Presa i boje (da može da se proizvede 10 MPa).

- Polikarbonatni filteri sa kapilarnim porama veličine pora 0,2 μm (prečnik 25 mm).

- Membranski filter od celuloznog estera veličine pora 5 μm koji se koristi kao pomoćni filter.

- Stakleni uređaj za filtraciju (ili filtracijski sistemi za jednokratnu upotrebu) za filtere prečnika 25 mm (npr. stakleni komplet za mikroanalizu Millipore, tip XX10 025 00).

- Sveže destilovana voda, filtrirana kroz filter veličine pora 0,2 μm radi uklanjanja mikroorganizama.

- Uređaj za naparivanje zlata ili zlata/paladijuma.

- Skenirajući elektronski mikroskop rezolucije do 10 nm i povećanjem × 10.000.

- Razno: špatule, skalpelski nož tip 24, pinceta, cevčice SEM, karbonski lepak ili karbonska lepljiva traka, koloidno srebro.

- Ultrazvučna sonda ili stona ultrazvučna kupka.

- Burgija za uzorkovanje jezgra ili burgija za plutu za uzimanje uzoraka iz MMMF ploča.

**1.5.3. Postupak ispitivanja**

*1.5.3.1. Uzorkovanje*

Za uzimanje uzoraka iz preseka tvrdih ili mekanih vlaknastih ploča koristi se burgija za uzorkovanje jezgra ili burgija za plutu od 25 mm. Uzorci se uzimaju u jednolikim razmacima po širini ploče, ako se radi o pločama male dužine, ili nasumično ako su raspoložive velike ploče. Ista oprema može se koristiti i za ekstrakciju slučajnih uzoraka slobodnih vlakana. Po mogućnosti treba uzeti šest uzoraka kako bi se uzele u obzir prostorne varijacije unutar materijala.

Šest jezgrovanih uzoraka izdrobi se u kalupu prečnika 50 mm pod pritiskom od 10 MPa. Materijal se promeša špatulom i ponovo kompresuje na 10 MPa. Materijal se zatim izvadi iz kalupa i čuva u zapečaćenoj staklenoj boci.

*1.5.3.2. Priprema uzorka*

Prema potrebi, vlakno treba ostaviti oko sat vremena u peći na temperaturi od 450 °C da bi se uklonilo organsko vezivo.

Uzorak se podeli na poduzorke postupkom četvrtanja kupe (to treba učiniti u komori za zaštitu od prašine).

Mala količina uzorka (< 0,5 g) doda se špatulom u 100 ml sveže destilovane vode koja je filtrirana kroz membranski filter 0,2 μm (mogu se koristiti i drugi izvori ultračiste vode ako se pokaže da su zadovoljavajućeg kvaliteta). Uzorak se dobro rasprši uz pomoć ultrazvučne sonde snage 100 W koja je podešena tako da izazove kavitaciju. (Ako sonda nije raspoloživa, koristi se sledeći postupak: uzorak protresti i okrenuti, ponavljajući postupak 30 sekundi; petominutna obrada u ultrazvučnom kupatilu; zatim se protresa i okreće još 30 sekundi.)

Čim se vlakno disperguje, izvadi se određeni broj alikvota (npr. tri alikvota od 3 ml, 6 ml i 10 ml) pipetom širokog grla (zapremine od 2 ml do 5 ml).

Svaki alikvot filtrira se pod vakuumom kroz polikarbonatni filter 0,2 μm i pomoćni MES filter veličine pora 5µm, koristeći stakleni filter - levak sa cilindričnim sudom. U levak se ulije oko 5 ml filtrirane destilovane vode i alikvot polako pipetira u vodu držeći vrh pipete ispod meniska. Pipetu i sud treba temeljno isprati nakon pipetiranja jer tanka vlakna imaju tendenciju da se nakupljaju na površini.

Pažljivo ukloniti filter i odvojiti ga od pomoćnog filtera pa staviti u posudu da se osuši.

Kružnim pokretom odseče se jedna četvrtina ili jedna polovina dela filtera sa filterskim talogom koristeći skalpel tipa 24. Odsečeni deo se pažljivo pričvrsti na nosač SEM pomoću karbonske lepljive trake ili karbonskog lepka. Koloidno srebro treba naneti na najmanje tri mesta kako bi se poboljšao električni kontakt na krajevima filtera i nosača. Kada se lepak/koloidno srebro osuši, na površinu taloga se naparivanjem nanese oko 50 nm zlata ili zlato/paladijuma.

*1.5.3.3. Kalibracija i rad SEM*

1.5.3.3.1. Kalibracija

Kalibraciju SEM treba proveravati najmanje jedanput nedeljno (u idealnom slučaju jedanput dnevno) koristeći serifikovanu rešetku za kalibraciju. Kalibracija se proverava u odnosu na sertifikovani standard i ako izmerena vrednost (SEM) nije u granicama ± 2% odobrene vrednosti, kalibraciju SEM treba prilagoditi i ponovo proveriti.

Na stvarnoj matrici uzorka SEM ima mogućnost rezolucije bar minimalnog vidljivog prečnika od 0,2 µm, pri uvećanju x 2.000.

1.5.3.3.2. Rad

SEM treba podesiti na uvećanje od 10.000 i osigurati uslove koji daju dobru rezoluciju i prihvatljiv kvalitet slike pri malim brzinama skeniranja, npr. 5 sekundi po sličici. Iako različiti SEM mogu imati različite radne postavke, za najbolju vidljivost i rezoluciju kod rada sa materijalima relativno niske atomske mase uglavnom treba koristiti ubrzavajući napon od 5 keV do 10 keV i uređaj podesiti na malu veličinu tačke i kratku radnu udaljenost. Kad se sprovodi linearna putanja treba koristiti nagib od 0° da bi se smanjila potreba za ponovnim fokusiranjem, a ako SEM ima eucentričnu fazu, treba koristiti eucentričnu radnu udaljenost. Može se koristiti i manje uvećanje ako materijal ne sadrži mala vlakna (malog prečnika) i prečnici vlakana su veliki (> 5 μm).

*1.5.3.4. Određivanje veličine*

1.5.3.4.1. Ispitivanje uzorka pregledom pri malom uvećanju

Na početku uzorak treba pregledati pod malim uvećanjem da bi se otkrile eventualne naznake zgrušavanja velikih vlakana i procenila gustina vlakana. U slučaju preteranog zgrušavanja, preporučuje se da se pripremi novi uzorak.

Da bi se postigla statistička tačnost, potrebno je izmeriti određeni minimalni broj vlakana, a velika gustina vlakana može se smatrati poželjnim svojstvom jer ispitivanje praznih polja oduzima vreme, a ne doprinosi analizi. Međutim, ako je filter preopterećen, biće teško izmeriti sva merljiva vlakna, a neka manja vlakna se mogu i prevideti ako su sakrivena iza velikih vlakana.

Ako je gustina vlakana iznad 150 vlakana po milimetru linearne putanje, može se javiti pristrasnost u smislu previsoke procene LWGMD. S druge strane, male koncentracije vlakana produžavaju vreme analize i često je isplativije pripremiti uzorak čija je gustina vlakana bliža optimalnoj gustini nego nastaviti sa brojanjem na filterima sa niskom koncentracijom. Kod optimalne gustine vlakana treba prosečno da se dobije otprilike jedno do dva brojiva vlakna po vidnom polju pri uvećanju od 5.000. Optimalna gustina zavisi od veličine (prečnika) vlakana pa ispitivač u određenoj meri treba stručno da prosuđuje kako bi odlučio da li je gustina vlakana približno optimalna ili nije.

1.5.3.4.2. Određivanje prečnika vlakana dužinom

Broje se samo vlakna koja dodiruju (ili seku) (beskonačno) tanku crtu na ekranu SEM. Iz tog razloga treba povući vodoravnu (ili vertikalnu) crtu kroz sredinu ekrana.

Druga mogućnost je da se u sredini ekrana stavi jedna tačka i započne kontinuirano skeniranje u jednom smeru preko filtera. Meri se i beleži prečnik svakog vlakna odnosa stranica većeg od 3:1 koje dodiruje ili seče tu tačku.

1.5.3.4.3. Određivanje veličine vlakna

Preporučuje se da se izmeri najmanje 300 vlakana. Svako vlakno meri se samo jedanput u tački gde seče liniju ili tačku nacrtanu na slici (ili u blizini tačke preseka ako su ivice vlakna skrivene). Ako se naiđe na vlakna neujednačenog preseka, uzima se u obzir merenje koje predstavlja prosečni prečnik vlakna. Definisanje ivice i merenje najkraće udaljenosti između ivica vlakna zahteva poseban oprez. Određivanje veličine može da se vrši direktno tokom rada ili, na sačuvanim slikama odnosno fotografijama. Preporučuju se poluautomatski sistemi merenja slike koji podatke učitavaju direktno u tabelu, jer se tako štedi vreme i izbegavaju greške u prepisivanju, a izračunavanje se može automatizovati.

Krajeve dugačkih vlakana treba pregledati pod malim uvećanjem da bi se proverilo da ne zavijaju nazad u vidno polje merenja i da ne bi bili izmereni više puta.

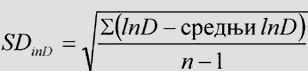
**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Prečnici vlakana obično nemaju normalnu raspodelu. Logaritamskom transformacijom može se dobiti približno normalna raspodela.

Izračuna se aritmetička sredina (srednji lnD) i standardna devijacija (SDlnD) vrednosti logaritma po bazi e (lnD) n prečnika vlakana (D).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| srednji *InD* = | *InD* |  |
| *n* |  |



Standardna devijacija podeli se sa kvadratnim korenom broja merenja (n) da bi se dobila standardna greška (SElnD).

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s060.gif

Da bi se dobila geometrijska sredina umanjena za dve geometrijske standardne greške, dvostruka standardna greška se oduzme od srednje vrednosti i izračuna eksponent te vrednosti (srednja vrednost minus dve standardne greške).

LWGMD - 2SE = *e*(srednjiInD-2SEInD)

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju naročito sadrži podatke o:

- vrednosti LWGMD-2SE;

- svim odstupanjima, a posebno onim koja mogu da utiču na preciznost ili tačnost rezultata, uz odgovarajuća obrazloženja.

*4. LITERATURA*

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive, February 1999. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive, Research and Laboratory Services Division, 1994.

**Prilog 2.**

**Metode ispitivanja svojstava hemikalija koja utiču na život i zdravlje ljudi**

**OPŠTI UVOD**

*A. OPIS SVOJSTAVA ISPITIVANE SUPSTANCE*

Pre početka studija toksičnosti potrebno je znati sastav ispitivane supstance uključujući i glavne nečistoće i značajna fizička i hemijska svojstva uključujući stabilnost.

Fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance važni su podaci za izbor puta primene, plana svake pojedinačne studije, kao i načina rukovanja i čuvanja ispitivane supstance.

Početku studije prethodi unapređivanje analitičke metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivane supstance (uključujući glavne nečistoće kada potrebno) u vehikulumu za primenu doze i biološkom materijalu.

U izveštaj o ispitivanju uključuju se svi podaci koje se odnose na identifikaciju, fizička i hemijska svojstva, čistoću i ponašanje ispitivane supstance.

*B. BRIGA O ŽIVOTINJAMA*

Pri ispitivanju toksičnosti važna je stroga kontrola uslova smeštaja i tehnika o odgovarajućoj brizi o životinjama.

**a) Uslovi smeštaja**

Uslovi smeštaja u prostorijama i kavezima za eksperimentalne životinje odgovaraju eksperimentalnoj vrsti koja se koristi. Za pacove, miševe i zamorce odgovarajući uslovi su: sobna temperatura od 22 °C ± 3 °C sa relativnom vlažnošću od 30% do 70%; a za kuniće temperatura je 20 °C ± 3° C sa relativnom vlažnošću od 30% do 70%.

Neke eksperimentalne tehnike naročito su osetljive na efekte temperature i u tim slučajevima detalji odgovarajućih uslova uključeni su u opis metode ispitivanja.

U svim istraživanjima toksičnih efekata temperatura i vlažnost se prate, beleže i uključuju u konačni izveštaj o ispitivanju.

Osvetljenje je veštačko sa smenjivanjem 12 sati svetla i 12 sati mraka. Detalji o osvetljenosti tokom eksperimenta beleže se i uključuju u konačni izveštaj o ispitivanju.

Ako nije drugačije propisano u metodi ispitivanja, životinje se mogu smestiti u odgovarajući smeštaj za pojedinačno i odvojeno držanje ili u kavezima u malim grupama istog pola. U slučaju grupnog smeštaja ne stavljan se više od pet životinja u kavez.

U izveštaju o ispitivanju na životinjama važno je naznačiti tip kaveza i broj životinja smeštenih u svakom kavezu za vreme izlaganja hemikaliji i u svakom kasnijem periodu posmatranja.

**b) Ishrana**

Ishrana zadovoljava sve nutritivne zahteve vrste koja se koristi u ispitivanju. Kada se ispitivane supstance daju životinjama preko hrane, nutritivna vrednost može da bude smanjena usled međusobnog uticaja supstance i sastojaka hrane. Mogućnost ovakvog uticaja razmatra se pri tumačenju rezultata ispitivanja. Može se upotrebiti uobičajena laboratorijska hrana sa slobodnim pristupom vodi za piće. Na izbor hrane može da utiče potreba da se obezbedi odgovarajuća smeša ukoliko se ispitivana supstanca daje preko hrane.

Nečistoće u hrani za koje se zna da utiču na toksičnost ne bi trebalo da su prisutne u koncentracijama koje utiču na rezultate ispitivanja.

*V. ALTERNATIVNA ISPITIVANJA*

Evropska unija promoviše razvoj i priznavanje alternativnih metoda koje mogu da daju isti nivo informacija kao sadašnja ispitivanja na životinjama, ali koje koriste manje životinja, izazivaju manje patnje ili izbegavaju upotrebu životinja.

Takve metode, kada budu dostupne, uzimaju se u obzir za karakterizaciju opasnosti i klasifikaciju koja sledi, kao i za obeležavanje opasnosti i procenu bezbednosti hemikalije kad god je to moguće.

*G. PROCENA I TUMAČENJE*

Kada se ispitivanja procenjuju i tumače, razmatraju se ograničenja direktne ekstrapolacije rezultata ispitivanja na životinjama i *In vitro* studija na čoveka, i zato se za potvrdu rezultata ispitivanja mogu, kada su dostupni, koristiti dokazi o štetnim efektima na ljude.

*D. LITERATURA*

Većina ovih metoda razvijena je u okviru programa Organizacije za ekonomski razvoj i saradnju (u daljem tekstu: OECD) i sprovode se u skladu sa principima Dobre laboratorijske prakse, da bi se obezbedilo šire "uzajamno prihvatanje podataka".

Dodatne informacije mogu se naći u preporukama u OECD vodičima i literaturi.

**B.1 bis. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST - METODA FIKSNIH DOZA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 420 (2001).

*1.1. UVOD*

U tradicionim metodama za određivanje akutne toksičnosti određene ispitivane supstance smrt životinja koristi se kao ciljni pokazatelj ispitivanja toksičnosti (endpoint). Britansko toksikološko udruženje predložilo je 1984. godine, na osnovu primene niza fiksnih doza**1**, novi pristup ispitivanja akutne toksičnosti. Ovaj pristup zasniva se na posmatranju jasnih znakova toksičnosti jednog od niza fiksnih doznih nivoa, kako bi se izbeglo uginuće životinja kao ciljni pokazatelj. Nakon *in vivo* validiranih ispitivanja (Velika Britanija**2** i međunarodna**3**), postupak fiksnih doza je 1992. godine prihvaćen kao metoda ispitivanja. Kasnije su statistički podaci postupka fiksnih doza validirani pomoću matematičkih modela u nizu ispitivanja**4,5,6**. Zajedno su *in vivo* ispitivanja i studije na modelima pokazale da je postupak reproduktivan, koristi se manji broj životinja i u poređenju sa tradicionalnim metodama izaziva manju patnju životinja, a rangira toksičnost supstance podjednako dobro kao i druge razvijene metode ispitivanja akutne toksičnosti.

Uputstva za izbor najbolje metode ispitivanja za određenu namenu mogu se pronaći u literaturi**7** koja sadrži dodatne informacije o izvođenju i tumačenju rezultata dobijenih metodom ispitivanja B.1 *bis*.

Princip ove metode ispitivanja jeste da se u glavnom ispitivanju koriste samo umereno toksične doze, a izbegavaju potencijalno smrtonosne doze. Izbegava se i primena onih doza za koje je poznato da usled pojave korozivnog oštećenja ili jake iritacije izazivaju značajan bol ili stres kod životinja. Životinje koje su na samrti ili su jasno izložene intenzivnom bolu ili stresu, lišavaju se života na human način, a u konačnoj obradi rezultata tretiraju se na isti način kao i životinje koje uginu za vreme ispitivanja. U posebnom vodiču**8** dati su kriterijumi prema kojima se životinje koje su na samrti ili jako pate lišavaju života na human način, a definisani su i simptomi na osnovu kojih je lako prepoznati neminovnu smrt.

Ova metoda ispitivanja obezbeđuje podatke o opasnim svojstvima supstance i omogućava procenu i klasifikaciju prema Globalno harmonizovanom sistemu za klasifikaciju i obeležavanje UN (u daljem tekstu: GHS) u odnosu na akutnu toksičnost**9**.

Pre početka studije uzimaju se u obzir svi dostupni podaci o ispitivanoj supstanci. Podaci uključuju identitet i hemijsku strukturu supstance; njena fizička i hemijska svojstva; rezultate obavljenih *in vitro* ili *in vivo* ispitivanja toksičnosti; toksikološke podatke o strukturno sličnim supstancama; kao i predviđene načine korišćenja supstance. Ovi podaci ukazuju na važnost izvođenja studije za zaštitu zdravlja ljudi, a pomažu i pri izboru odgovarajuće početne doze.

*1.2. DEFINICIJE*

Akutna oralna toksičnost jeste svojstvo hemikalije da izazove štetne efekte nakon primene pojedinačne peroralne doze ili nekoliko peroralnih doza u periodu od 24 sata.

Odložena smrt jeste uginuće životinja koje ne uginu ili nisu životno ugrožene tokom prvih 48 sati, već do uginuća dolazi u periodu posmatranja od 14 dana.

Doza jeste količina primenjene ispitivane supstance. Izražava se kao masa ispitivane supstance po jedinici telesne mase (TM) eksperimentalne životinje (mg/kg).

Evidentna toksičnost jeste toksični efekat kod koga se javljaju jasni znakovi toksičnosti nakon primene ispitivane supstance (za primere videti u literaturi**3**), koji su toliko intenzivni da bi izlaganje sledećoj većoj fiksnoj dozi kod životinja verovatno dovelo do jakog bola, stresa, iscrpljenosti, stanja na samrti (kriterijumi su prikazani u Vodiču**8** ili do smrtnog ishoda).

GHS jeste skraćenica za Globalno harmonizovan sistem za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija UN. Razvoj ovog sistema je zajednički napor OECD, UN Komiteta stručnjaka za transport opasnog tereta (fizička i hemijska svojstva) i Međunarodne organizacije rada (ILO), a koordinira ga Međuorganizacijski program za pravilno upravljanje hemikalijama (IOMC).

Neminovna smrt jeste očekivana smrt životinje koja je na samrti ili se njena smrt očekuje pre planiranog narednog vremena posmatranja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodara su konvulzije, lateralni položaj, ležeći položaj ili tremor (za detalje videti u literaturi**8**).

LD50 (srednja smrtna doza) jeste statistički određena pojedinačna doza supstance za koju se očekuje da izaziva smrtnost kod 50 posto ispitivanih životinja kada se primeni peroralnim putem. Vrednost LD50 izražava se u jedinici mase ispitivane supstance po jedinici telesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Granična doza jeste gornja granična doza koja se koristi u ispitivanju (2.000 mg/kg ili 5.000 mg/kg).

Stanje na samrti jeste stanje definisano kao nemogućnost preživljavanja ili neminovna smrt životinje, čak i nakon eventualnog tretmana (za detalje videti u literaturi**8**).

Predvidljiva smrt jeste stanje koje karakteriše prisutnost kliničkih znakova koji ukazuju na neminovnu smrt životinje pre završetka eksperimenta, na primer nemogućnost uzimanja vode ili hrane (za detalje videti u literaturi**8**).

*1.3. PRINCIP METODE*

Na grupe životinja istog pola postupno se (korak po korak) primenjuju fiksne doze od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg (izuzetno, može se razmotriti i primena još jedne fiksne doze od 5.000 mg/kg, videti odeljak 1.6.2 ove metode). Količina inicijalne doze bira se na osnovu prethodnih ispitivanja. Primenjuje se ona doza za koju se očekuje da će rezultirati nekim znakovima toksičnosti, pri čemu ova doza neće izazvati teško trovanje ili smrt. Klinički znakovi ili stanja koja upućuju na jak bol, patnju ili neminovnu smrt životinje detaljno su opisani u posebnom OECD Vodiču**8**. Nakon primene inicijalne doze grupe životinja koje se dalje uključuju u ispitivanje mogu se dozirati većim ili manjim fiksnim dozama, u zavisnosti od toga da li su prisutni znakovi koji ukazuju na toksičnost ili uginuće. Ovaj postupak se nastavlja do primene doze koja izaziva evidentnu toksičnost ili smrt najviše jedne životinje. Postupak se prekida kada najveća primenjena doza ne izazove toksične efekte ili kada najniža primenjena doza dovede do smrti životinja.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Izbor životinjske vrste**

Preporučena vrsta glodara je pacov, iako se za ispitivanja koriste i druge životinjske vrste. Najčešće se koriste ženke**7**, jer je na osnovu literature koja se odnosi na ispitivanje LD50 uočeno da je mala razlika u osetljivosti polova pri primeni ove metode. U slučajevima u kojima je uočena razlika, ženke su pokazale nešto veću osetljivost**10**. Ako se u literaturi pronađu toksikološki ili toksikokinetički podaci za strukturno slične hemikalije koji ukazuju na to da su mužjaci osetljiviji na određenu ispitivanu supstancu, koriste se mužjaci za ispitivanje. Kad se ispitivanje izvodi na mužjacima, navodi se opravdanost za njihovu primenu.

Ispitivanje se izvodi na zdravim mladim jedinkama onih laboratorijskih sojeva koji se uobičajeno koriste u ovakvim ispitivanjima. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i nisu gravidne. Svaka životinja, na početku ispitivanja i primene prvih doza ispitivane supstance, treba da bude stara između 8 i 12 nedelja, a njena telesna masa treba da bude u opsegu ± 20% od srednje vrednosti mase prethodno doziranih životinja.

**1.4.2. Uslovi smeštaja i ishrana**

Temperatura prostorije u kojoj se drže životinje je 22° C (± 3° C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30%, ali ne više od 70% (osim kada se prostorije čiste). Idealno je vlažnost vazduha održavati između 50% i 60%. Osvetljenje je veštačko, i to u intervalima od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Za ishranu se može primenjivati uobičajena hrana za laboratorijske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće. Životinje se prema primenjenoj dozi ispitivane supstance mogu grupisati u kaveze. Broj životinja po kavezu ne sme ni na koji način da ometa proces praćenja i posmatranja svake životinje.

**1.4.3. Priprema životinja**

Životinje se biraju nasumce, obeležavaju radi lakšeg razlikovanja, a da bi se prilagodile na laboratorijske uslove drže se u kavezima najmanje pet dana pre početka eksperimenta i primene prve doze ispitivane supstance.

**1.4.4. Priprema doza**

Ispitivane supstance primenjuju se u konstantnim zapreminama, pa je neophodno prilagođavanje koncentracije za pripremanje različitih doza. Pri ispitivanju hemikalije u tečnom stanju, primena nerazblažene ispitivane supstance, odnosno supstance koja je u smeši u konstantnoj koncentraciji, može da bude značajna za kasniju procenu rizika od te supstance. Maksimalna pojedinačna zapremina doze ne sme da se prekorači. Maksimalna zapremina tečnosti koja sme da se primeni zavisi i od veličine eksperimentne životinje. Zapremina ispitivane supstance koja se primenjuje kod glodara ne bi smela da prelazi 1 ml/100g TM životinje; a ukoliko se primenjuje vodeni rastvor može se razmotriti i doza od 2 ml/100g TM životinje. Kad je reč o formulaciji i pripremi doze, prvenstveno se preporučuje primena vodenog rastvora/suspenzije/emulzije, a zatim rastvora/suspenzije/emulzije u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za sve vehikulume osim vode neophodno je znati njihove toksikološke karakteristike. Doze se pripremaju neposredno pre primene, osim ako se radi o supstanci za koju je poznato da je stabilna u rastvoru tokom dužeg vremenskog perioda.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Primena doza**

Ispitivana supstanca primenjuje se u jednoj dozi sondom direktno u želudac ili intubiranjem kanilom. U posebnim okolnostima, kada jednokratna doza nije moguća, ispitivana supstanca može se primeniti u nekoliko manjih porcija tokom vremenskog perioda koji nije duži od 24 sata.

Pre početka primene doza ispitivane supstance, potrebno je izgladneti životinje (npr. pacovima je potrebno uskratiti hranu ali ne i vodu preko noći; miševima je potrebno uskratiti hranu ali ne i vodu na 3 do 4 sata). Nakon perioda gladovanja, potrebno je izmeriti telesnu masu životinja i primeniti ispitivanu supstancu. Nakon prve doze, hrana može ponovno da se uskrati, i to: kod pacova narednih 3 do 4 sata, a kod miševa naredna 1 do 2 sata. Kada se doza ispitivane supstance primeni u nekoliko manjih porcija u određenom vremenskom intervalu, može da se ukaže potreba za hranom i vodom ukoliko se radi o produženom vremenskom periodu.

**1.5.2. Prethodno ispitivanje**

Cilj prethodnog ispitivanja životinja je određivanje odgovarajuće početne doze za glavno ispitivanje. Ispitivana supstanca primenjuje se na pojedinačnim životinjama postupno kao što je opisano u dijagramu toka ispitivanja koji je dat u Delu drugom ove metode. Prethodno ispitivanje je završeno kada je moguće doneti odluku o početnoj dozi (ili u slučajevima kada dođe do uginuća već kod najniže fiksne doze).

Početna doza za prethodno ispitivanje može da bude fiksni dozni nivo od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg, a definisana je kao ona doza koje će izazvati jasne znakove toksičnosti, odabrana na osnovu podataka *in vivo* i *in vitro* ispitivanja za ispitivanu supstancu ili druge strukturno slične hemikalije. Ukoliko nema ovakvih podataka, za početnu dozu uzima se koncentracija od 300 mg/kg.

Potrebno je napraviti pauzu od najmanje 24 sata između primene doza ispitivane supstance kod svake pojedinačne životinje. Životinje je potrebno posmatrati kroz vremenski period od najmanje 14 dana.

Izuzetno, i samo u slučajevima kad to opravdavaju specifične potrebe, može da se razmotri primena još jedne veće fiksne doze od 5.000 mg/kg (videti Deo četvrti ove metode). Zbog dobrobiti životinja, ne preporučuje se ispitivanje na životinjama za klasifikaciju ispitivane supstance u Kategoriju 5 prema GHS-u (u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg), i razmatra se samo u slučajevima kada postoji velika verovatnoća da će rezultati ovakvog ispitivanja imati neposredan značaj za zaštitu zdravlja ljudi ili životne sredine.

U slučajevima kada u prethodnom ispitivanju već kod najniže primenjene fiksne doze (5 mg/kg) dođe do smrti eksperimentne životinje, uobičajen postupak je da se ispitivanje završi, a ispitivana supstanca klasifikuje u Kategoriju 1, prema GHS-u (kao što se može videti u Delu drugom ove metode). Ukoliko je potrebna dodatna potvrda za ovakvu klasifikaciju, može se sprovesti dodatno ispitivanje i to tako što se druga životinja dozira sa 5 mg/kg. Ako dođe do smrti i druge životinje, smatra se potvrđenom klasifikacija u Kategoriju 1 prema GHS-u, i obustavljaju se sva dalja ispitivanja. Ako druga životinja preživi, tada se na najviše tri dodatne životinje primenjuje doza od 5 mg/kg. Zbog visokog rizika od smrtnosti, naknadno uvedene životinje potrebno je uključivati u eksperiment jednu po jednu radi dobrobiti životinja. Vremenski razmak između doziranja kod pojedinačnih životinja je dovoljno dugačak da može lako da se predvidi preživljavanje prethodne životinje. Ako ipak dođe do drugog slučaja smrti, odmah se završava primena niza doza ispitivane supstance tako da se ispitivanje ne vrši dalje ni na jednoj životinji. Budući da pojava drugog slučaja uginuća (nevezano od broja životinja koje se ispituju u momentu kada se odluči da se eksperiment završi) spada pod ishod A koji je dat u Delu drugom ove metode (dve ili više smrti), primenjuje se klasifikaciono pravilo iz Dela trećeg ove metode pri fiksnoj dozi od 5 mg/kg (klasifikacija u Kategoriju 1 ako dođe do dve ili više slučaja smrti, ili u Kategoriju 2 ukoliko dođe do smrti kod jedne životinje). U Delu petom ove metode date su smernice za klasifikaciju prema Pravilniku o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda ("Službeni glasnik RS", br. 59/10, 25/11 i 5/12), dok ne počne sa primenom Pravilnika o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN ("Službeni glasnik RS", br. 64/10 i 26/11).

**1.5.3. Glavno ispitivanje**

*1.5.3.1. Broj životinja i dozni nivoi*

Na dijagramu toka u Delu trećem ove metode prikazani su postupci koji se preduzimaju u ispitivanju nakon primene početnog doznog nivoa. Preduzima se jedan od tri koraka: prekid ispitivanja i klasifikacija u odgovarajuću klasu opasnosti ili ispitivanje većom fiksnom dozom ili ispitivanje manjom fiksnom dozom. Da bi se zaštitile životinje, dozni nivo koji je u prethodnom ispitivanju doveo do smrti životinje ne primenjuje se u glavnom ispitivanju (videti Deo treći ove metode). Iskustvo je pokazalo da je pri početnom doznom nivou najverovatniji ishod glavnog ispitivanja klasifikacija ispitivane supstance, tako da dalja ispitivanja nisu neophodna.

Za ispitivanje pri svakom doznom nivou koristi se ukupno pet životinja istog pola. Grupu od pet životinja čine jedna životinja iz prethodnog ispitivanja (kojoj je primenjena odabrana fiksna doza) i dodatne četiri životinje (osim u posebnim slučajevima kada se dozni nivo iz glavnog ispitivanja nije koristio u prethodnom ispitivanju).

Vremenski razmak između primene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou određen je početkom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Tretman životinja sledećom dozom se odlaže sve dok se ne uverimo u preživljavanje prethodno tretiranih životinja. Pravi se vremenski razmak od 3 do 4 dana između primene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou, kako bi se omogućio dovoljno dug period za posmatranje eventualnih odloženih toksičnih reakcija. Ovaj vremenski interval može po potrebi da se menja, npr. u slučajevima u kojima su posmatranja nejasna. Kada se razmatra korišćenje fiksne doze od 5.000 mg/kg, potrebno je pratiti postupak koji je opisan u Delu četvrtom ove metode (videti odeljak 1.6.2. ove metode).

*1.5.3.2. Ispitivanje granične doze*

Ispitivanje granične doze primarno se koristi u situacijama u kojima istraživač ima podatke koji ukazuju da je ispitivana hemikalija verovatno netoksična, tj. da postaje toksična samo iznad propisanih graničnih doza. Podaci o toksičnosti ispitivane hemikalije mogu se preuzeti iz završenih ispitivanja sa sličnim supstancama ili smešama, ako se uzme u obzir identitet i koncentracija komponenata izražena u procentima, za koje se pouzdano zna da su toksikološki značajne. U slučajevima gde nema podataka o toksičnosti ili ih nema dovoljno, ili kada se očekuje da će ispitivana hemikalija biti toksična, potrebno je isplanirati i obaviti glavno ispitivanje.

Za ispitivanje granične doze koristi se već ustanovljen postupak, sa početnom dozom definisanom u prethodnom ispitivanju od 2.000 mg/kg (ili izuzetno 5.000 mg/kg) i sa naknadnim uvođenjem dodatne četiri eksperimentne životinje na koje će se primeniti ista doza.

*1.6. POSMATRANJA*

Životinje se posmatraju pojedinačno nakon primene prve doze ispitivane supstance i to najmanje jednom tokom prvih 30 minuta i periodično tokom sledeća 24 sata, uz posebnu pažnju na prva 4 sata. Posmatranja se zatim obavljaju jedanput dnevno, u periodu od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno isključiti iz ispitivanja (ako je pronađena mrtva) ili je lišiti života na human način imajući u vidu dobrobit životinje. Trajanje posmatranja ne sme da bude strogo definisano, već ga određuju toksični efekti, početak i trajanje oporavka, a ukoliko postoji potreba može i da se produži. Važni su periodi u kojima se pojavljuju i nestaju prvi znaci toksičnosti, posebno ako se znaci toksičnosti javljaju odloženo**11**. Sva posmatranja sistematski se beleže, a za svaku životinju potrebno je voditi zasebni karton sa opažanjima.

Ako životinje neprekidno pokazuju znakove toksičnosti, potrebna su dodatna posmatranja. Potrebno je uključiti i promene na koži i krznu, očima i mukoznim membranama, kao i na respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, promene somatomotorne aktivnosti i promene ponašanja. Posebna pažnja se obraća na pojavu tremora, konvulzija, salivacije, proliva, letargije, pospanosti i kome. Za definisanje ovih stanja koriste se principi i kriterijumi koji su dati u literaturi**8**. Životinje pronađene na samrti ili one koje trpe jak bol ili stres, lišavaju se života na human način. Kada su životinje lišene života iz humanih razloga ili su pronađene mrtve, potrebno je što preciznije zabeležiti vreme smrti.

**1.6.1. Telesna masa**

Individualna telesna masa životinja određuje se neposredno pre primene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno nakon tog perioda. Beleže se i izračunavaju promene u telesnoj masi. Na kraju ispitivanja, meri se telesna masa preživelih životinja, a potom se lišavaju života na human način.

**1.6.2. Patološka ispitivanja**

Sve ispitivane životinje (uključujući i one koje uginu u toku ispitivanja ili su isključene iz ispitivanja zbog dobrobiti životinje) potrebno je postmortalno pregledati. Za svaku životinju beleže se sve značajne patološke promene. Mikroskopskim pregledom organa mogu se dobiti korisni podaci, pa je potrebno obaviti pregled organa koji su postmortalnim pregledom pokazali značajne patološke promene i to kod životinja koje su preživele 24 ili više sati nakon prve doze.

**2. PODACI**

Potrebno je prikupiti podatke za svaku životinju. Svi podaci se tabelarno prikazuju, a za svaku ispitivanu grupu navodi se ukupan broj životinja u grupi, broj životinja koje su pokazale znakove toksičnosti, broj životinja koje su pronađene mrtve ili broj onih koje se lišavaju života na human način tokom ispitivanja, vreme smrti pojedinačnih životinja, opis i vremenski tok toksičnih efekata i njihovu reverzibilnost, kao i nalaze postmortalnog pregleda.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

PISANJE IZVEŠTAJA

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, čistoću, i, kada je značajno, fizička i hemijska svojstva (uključujući izomerizaciju);

- identifikacione podatke koji uključuju i CAS broj.

2. Podatke o vehikulumu (ako je značajno):

- obrazloženje za izbor vehikuluma, ukoliko nije voda.

3. Podatke o eksperimentnoj životinji:

- vrsta/soj;

- mikrobiološki status životinje, ako je poznat;

- broj, starost i pol životinja (uključujući, kada je značajno, obrazloženje ukoliko se koriste mužjaci umesto ženki);

- izvor, uslove smeštaja, ishrane, itd.

4. Podatke o uslovima ispitivanja:

- detalje o formulaciji ispitivane supstance, uključujući fizičko stanje u kome je primenjena formulacija;

- detalje o primeni ispitivane supstance uključujući zapremine doza i vreme primene doze ispitivane supstance;

- detalje o kvalitetu hrane i vode uključujući detalje o vrsti i izvoru hrane i izvoru vode;

- obrazloženje za izbor početne doze.

5. Rezultate:

- tabelarni prikaz rezultata i primenjene doze za svaku životinju (životinje koje pokazuju znakove toksičnosti uključujući smrtnost, prirodu, intenzitet i trajanje toksičnih efekata);

- tabelarni prikaz telesne mase i promena telesne mase;

- individualnu telesnu masu životinja na dan primene doze ispitivane supstance, zatim u nedeljnim intervalima, i u vreme uginuća ili lišavanja života na human način;

- datum i vreme smrti, ako do nje dođe pre predviđenog lišavanja života na human način;

- vremenski tok pojave znakova toksičnosti, i da li su znakovi bili reverzibilni za svaku životinju;

- nalaze postmortalnih pregleda i histopatološki nalazi za svaku životinju, ukoliko su dostupni.

6. Diskusiju i tumačenje rezultata.

7. Zaključke.

**4. LITERATURA**

1. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

2. Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol.‚ 6, 279-291.

3. Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

4. Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

5. Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 -196.

7. OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

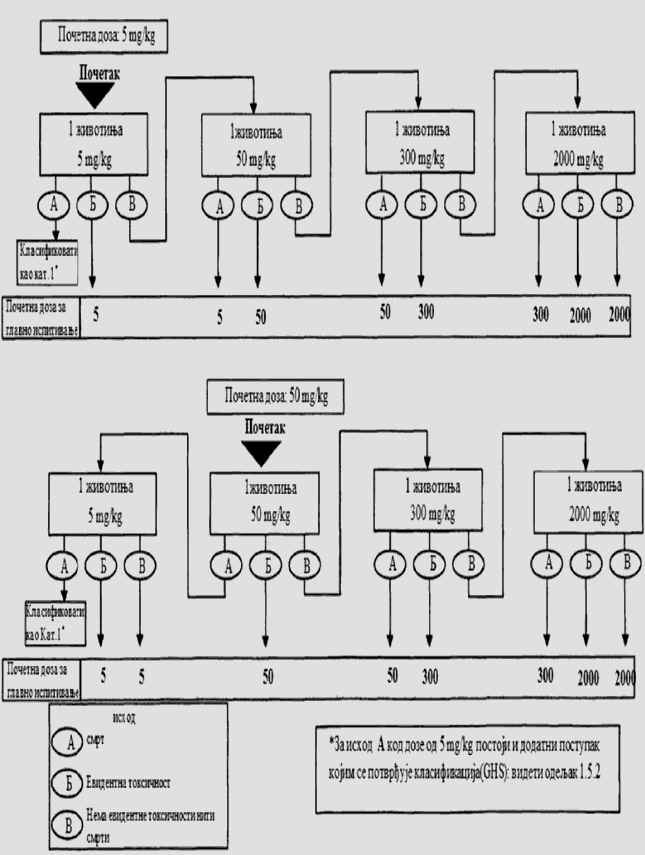
9. OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

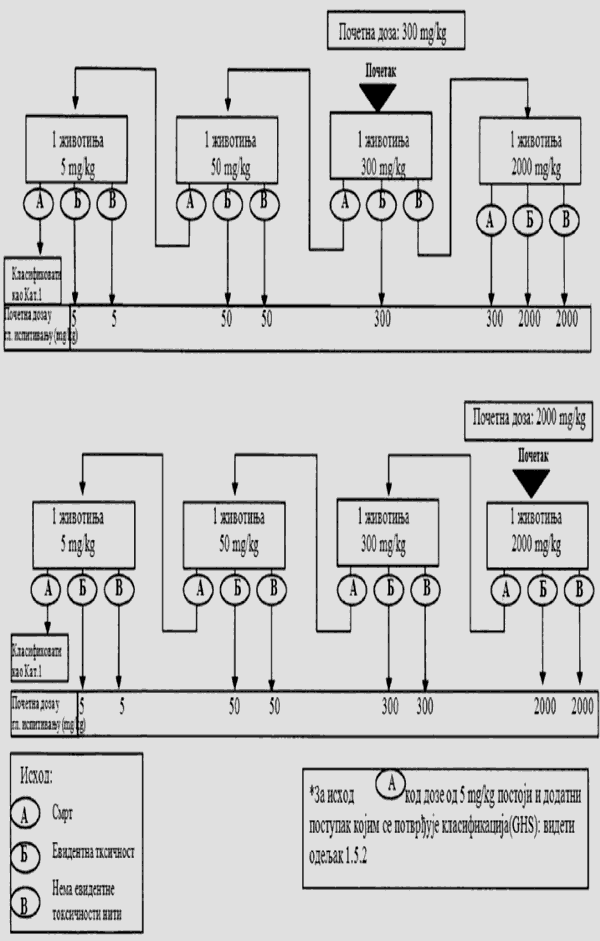
10. Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

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

**Deo drugi**

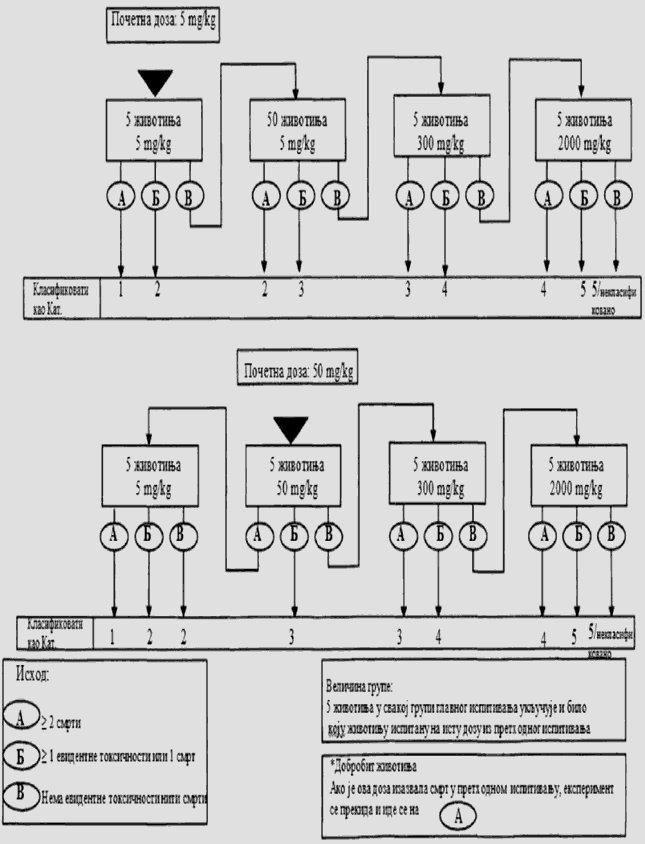
**DIJAGRAM TOKA ZA PRETHODNO ISPITIVANJE**

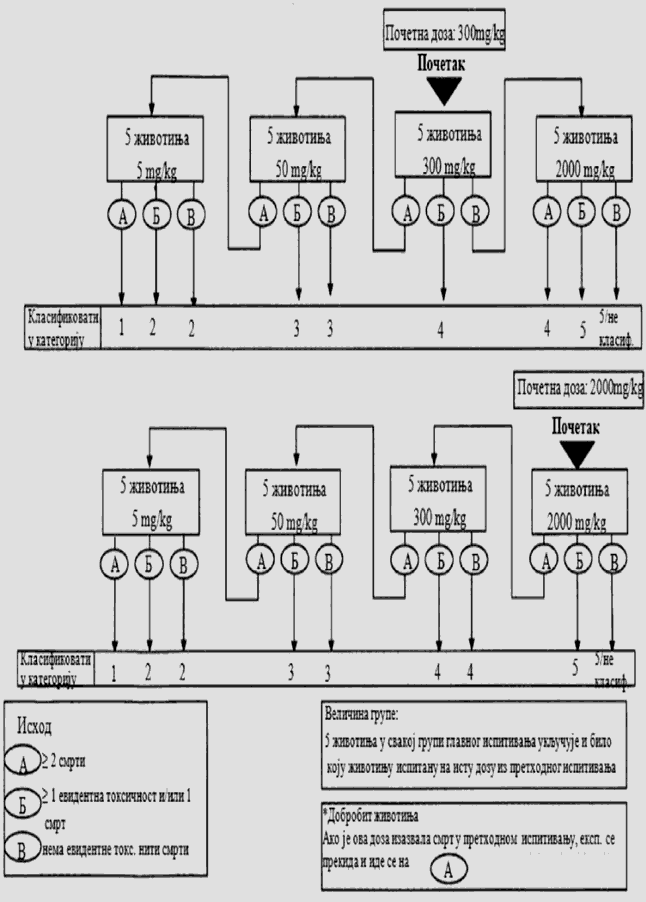




**Deo treći**

**DIJAGRAM TOKA ZA GLAVNO ISPITIVANJE**





**Deo četvrti**

**KRITERIJUMI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH SUPSTANCI SA OČEKIVANIM VREDNOSTIMA LD50 IZNAD 2.000 mg/kg ZA KOJE NIJE POTREBNO DODATNO ISPITIVANJE**

Kriterijum za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorija 5 (po GHS-u) omogućava identifikovanje ispitivanih supstanci koje pokazuju nisku akutnu toksičnost, ali koje pod određenim okolnostima mogu da predstavljaju opasnost za osetljive populacije. Ove supstance imaju vrednosti LD50 (peroralno) i LD50 (dermalno) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg ili potpuno odgovarajućih doza primenjenih drugim putevima unosa. Ispitivane supstance klasifikuju se u odgovarajuću kategoriju opasnosti (Kategorija 5 po GHS-u) ako je: 2.000 mg/kg < LD50 < 5.000 mg/kg, u sledećim slučajevima:

a) ako bilo koja od shema ispitivanja datih u Delu trećem ove metode upućuje na ovu kategoriju zbog učestalosti smrtnih slučajeva,

b) ako postoje pouzdani dokazi da je vrednost LD50 u opsegu vrednosti koji odgovara Kategoriji 5; ili ako druge studije toksičnosti sprovedene na životinjama ili ljudima ukazuju na potencijalne akutne toksične efekte na zdravlje ljudi,

v) ako se ekstrapolacijom, procenom ili merenjem podataka ne ustanovi pripadnost nekoj višoj klasi opasnosti, a:

- postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajne toksične efekte kod ljudi ili

- uoči se smrt pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, peroralnom primenom odgovarajuće doze ili

- stručnom procenom se potvrde značajni klinički znakovi toksičnosti, pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, pri čemu klinički znakovi ne uključuju proliv, piloerekciju ili zapušteni izgled ili

- se stručnom procenom potvrdi postojanje značajnih akutnih toksičnih efekata iz drugih ispitivanja sprovedenih na životinjama.

ISPITIVANJE DOZA IZNAD 2.000 mg/kg

Izuzetno, u slučajevima kad to opravdavaju specifične potrebe, dodatno može da se razmotri primena fiksne doze od 5.000 mg/kg. Zbog zaštite životinja i njihove dobrobiti ne preporučuje se ispitivanje doze od 5.000 mg/kg. Primena ove doze razmatra se samo u slučajevima kad postoji velika verovatnoća da će rezultati ispitivanja imati značajan doprinos zaštiti zdravlja ljudi ili životinja**9**.

Prethodno ispitivanje

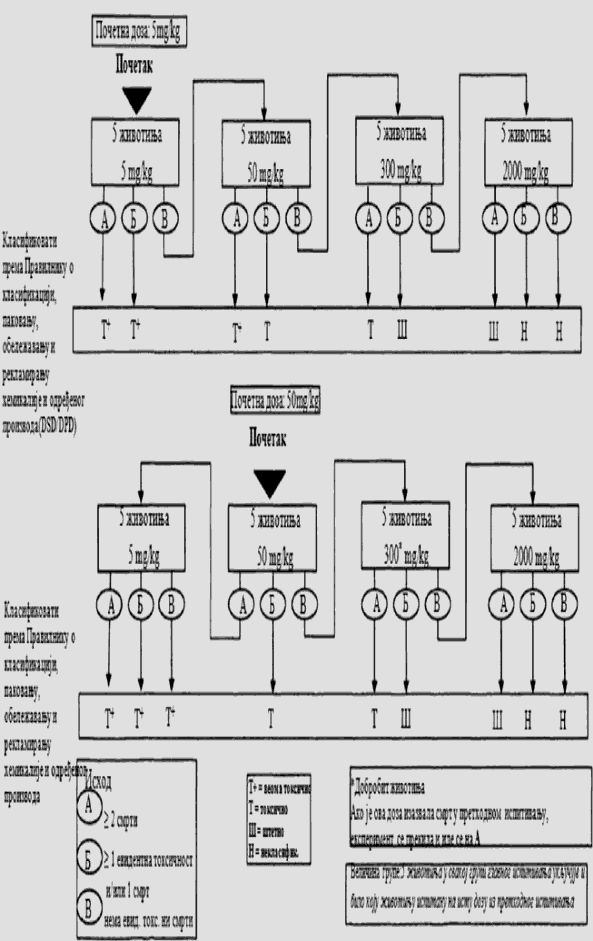
Pravila za primenu postupka koji se sastoji iz niza koraka koji je dat u Delu drugom ove metode, proširuju se na primenu doze od 5.000 mg/kg. Kada se u prethodnom ispitivanju koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ishod A (smrt) zahteva ispitivanje i druge životinje na primenu doze od 2.000 mg/kg; ishodi B i V (evidentna toksičnost ili nema toksičnosti) dozvoljavaju primenu doze od 5.000 mg/kg kao početne doze u glavnom ispitivanju. Ako se ne koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ispitivanje se nastavlja do primene doze od 5.000 mg/kg u slučaju ishoda pod B ili V pri dozi od 2.000 mg/kg; ako kod primenjene doze od 5.000 mg/kg dođe do ishoda A tada se u glavnom ispitivanju koristi početna doza od 2.000 mg/kg, a ishodi pod B i V nalažu početnu dozu od 5.000 mg/kg u glavnom ispitivanju.

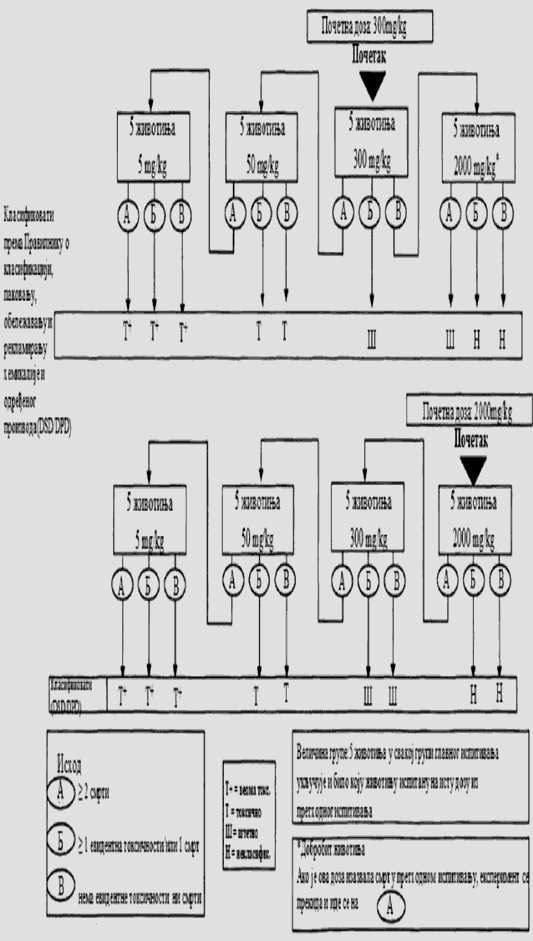
Glavno ispitivanje

Pravila za primenu postupka iz niza koraka koji je dat u Delu trećem ove metode, proširuju se na primenu doze od 5.000 mg/kg. Kada se u glavnom ispitivanju koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ishod A (dve ili više smrti) uslovljava ispitivanje druge grupe životinja primenom doze od 2.000 mg/kg; dok ishod B (evidentna toksičnost i/ili jedna ili manje smrti) ili ishod V (nema toksičnosti) dovode do klasifikacije supstance prema GHS-u. Ako se ne koristi početna doza od 5.000 mg/kg, u slučaju ishoda V, pri dozi od 2.000 mg/kg, ispitivanje se nastavlja do primene doze od 5.000 mg/kg. Ishod A kod primenjene doze od 5.000 mg/kg dovodi do klasifikacije supstance u Kategoriju 5 (prema GHS). Ishodi B ili V dovode do nemogućnosti klasifikacije supstance.

**Deo peti**

**METODA ISPITIVANJA B.1 BIS-SMERNICE ZA KLASIFIKACIJU (PREUZETO IZ LITERATURE8)**





**B.1 tris AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST - METODA ODREĐIVANJA KLASE AKUTNE TOKSIČNOSTI**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 423 (2001).

*1.1. UVOD*

Metoda određivanja klase akutne toksičnosti**1** koja je data u ovom ispitivanju jeste postupak (korak po korak) u kome se u svakom koraku koriste po tri životinje istog pola. U zavisnosti od smrtnosti odnosno stanja na samrti kod životinja, potrebno je da se prođe prosečno dva do četiri koraka da bi se doneo zaključak o akutnoj toksičnosti ispitivane supstance. Ovaj postupak je reproduktivan (ponovljiv), koristi veoma mali broj životinja i daje mogućnost klasifikacije supstanci na sličan način kao i ostale metode ispitivanja akutne toksičnosti. Metoda određivanja klase akutne toksičnosti zasnovana je na biometrijskim evaluacijama**2,3,4,5** sa fiksnim dozama koje su razdvojene na odgovarajući način kako bi se omogućilo rangiranje supstance za potrebe klasifikacije i procenu opasnosti. Kada je ova metoda ispitivanja usvojena, 1996. godine, bila je u velikoj meri validirana u *in vivo* ispitivanjima u odnosu na podatke o vrednosti LD50 koji su dobijeni iz domaće**6** i međunarodne**7** literature.

Uputstvo za izbor najpogodnije metode ispitivanja za određenu svrhu može se pronaći u literaturi**8**. Ovaj dokument sadrži i dodatne informacije o izvođenju i tumačenju rezultata dobijenih metodom ispitivanja B.1*tris*.

Ispitivane supstance se ne primenjuju na životinje u dozama za koje je poznato da izazivaju vidljiv bol i iscrpljenost usled korozivnog ili jakog iritativnog efekta. Životinje koje su na samrti, koje očito trpe jake bolove ili pokazuju znakove trajne iscrpljenosti lišavaju se života na human način, i pri tumačenju rezultata ispitivanja uzimaju se u obzir kao i životinje koje su uginule tokom ispitivanja. Kriterijum za donošenje odluke o lišavanju života bolesne ili životinje na samrti, kao i uputstva za prepoznavanje predstojeće i predvidljive smrti dati su u literaturi**9**.

U ovoj metodi ispitivanja koriste se unapred određene doze, a rezultati ispitivanja omogućavaju da se supstanca rangira i klasifikuje prema Pravilniku o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN odnosno GHS**10**.

Metoda ispitivanja nije namenjena izračunavanju precizne vrednosti LD50, ali omogućava utvrđivanje definisanih opsega doza gde je letalitet očekivan, jer se i u ovoj metodi kao ciljni pokazatelj ispitivanja još uvek koristi smrt određenog procenta životinja. Metoda ispitivanja omogućava određivanje vrednosti LD50 samo u slučaju kada najmanje dve primenjene doze dovode do letaliteta koji je viši od 0% a manji od 100%. Korišćenje unapred određenih doza koje su izabrane nezavisno od ispitivane supstance, zajedno sa klasifikacijom koja je jasno povezana sa brojem životinja posmatranih u različitim okolnostima, povećava mogućnost konzistentnih izveštaja i ponovljivost.

Pre početka studije uzimaju se u obzir svi dostupni podaci o ispitivanoj supstanci. Podaci uključuju identitet i hemijsku strukturu supstance, njena fizička i hemijska svojstva, rezultate drugih *in vivo* ili *in vitro* ispitivanja toksičnosti, toksikološke podatke strukturno sličnih supstanci, kao i predviđene načine korišćenja supstance. Ovi podaci su neophodni da bi se ukazalo na važnost izvođenja studije za zaštitu zdravlja ljudi, a pomažu i pri izboru odgovarajuće početne doze.

*1.2. DEFINICIJE*

Akutna oralna toksičnost jeste svojstvo hemikalije da izazove štetne efekte nakon primene pojedinačne peroralne doze ili nekoliko peroralnih doza u periodu od 24 sata.

Odložena smrt jeste uginuće životinja koje ne uginu ili nisu životno ugrožene tokom prvih 48 sati, već do uginuća dolazi u periodu posmatranja od 14 dana.

Doza jeste količina primenjene ispitivane supstance. Izražava se kao masa ispitivane supstance po jedinici telesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Evidentna toksičnost jeste toksični efekat kod koga se javljaju jasni znakovi toksičnosti nakon primene ispitivane supstance (za primere videti literaturu**3**), koji su toliko intenzivni da bi izlaganje sledećoj većoj fiksnoj dozi kod životinja verovatno dovelo do jakog bola, stresa, iscrpljenosti, stanja na samrti (kriterijumi su dati u literaturi**8**) ili smrtnog ishoda.

GHS jeste skraćenica za Globalno harmonizovan sistem za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija UN. Razvoj ovog sistema je zajednički napor OECD (zdravlje ljudi i životna sredina), UN Komiteta stručnjaka za transport opasnog tereta (fizička i hemijska svojstva) i Međunarodne organizacije rada (ILO) (saopštavanje opasnosti), a koordinira ga Međuorganizacijski program za upravljanje hemikalijama (IOMC).

Neminovna smrt jeste očekivana smrt životinje koja je na samrti ili se njena smrt očekuje pre planiranog narednog vremena posmatranja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodara su konvulzije, lateralni položaj, ležeći položaj ili tremor (za detalje videti literaturu**8**).

LD50 (srednja smrtna doza) jeste statistički određena pojedinačna doza supstance za koju se očekuje da izaziva smrtnost kod 50 posto ispitivanih životinja kada se primeni peroralnim putem. Vrednost LD50 izražava se u jedinici mase ispitivane supstance po jedinici telesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Granična doza jeste gornja granična doza koja se koristi u ispitivanju (2.000 mg/kg ili 5.000 mg/kg).

Stanje na samrti jeste stanje definisano kao nemogućnost preživljavanja ili neminovna smrt životinje, čak i nakon eventualnog tretmana (za detalje videti literaturu**8**).

Predvidljiva smrt jeste stanje koje karakteriše prisutnost kliničkih znakova koji ukazuju na neminovnu smrt životinje pre završetka eksperimenta, na primer nemogućnost uzimanja vode ili hrane (za detalje videti literaturu**8**).

*1.3. PRINCIP METODE*

Princip ispitivanja koje je zasnovano na postupku (korak po korak) uz korišćenje minimalnog broja životinja po koraku, jeste da se prikupi dovoljno podataka o akutnoj toksičnosti ispitivane supstance kako bi se omogućila njena klasifikacija. Supstanca se daje grupi eksperimentnih životinja peroralno u jednoj od određenih doza. Supstanca se ispituje primenom postupka (korak po korak), pri čemu se u svakom koraku koriste tri životinje istog pola (uglavnom ženke). Izostanak ili prisustvo znakova koji upućuju na smrt kod životinja kojima se primenjuje doza u jednom od koraka određuje sledeći korak postupka, odnosno:

- da dalja ispitivanja nisu potrebna,

- potrebu primene iste doze na dodatne tri životinje,

- potrebu primene sledeće više ili niže doze na dodatne tri životinje.

Detalji postupka ispitivanja dati su u Delu drugom ove metode. Ova metoda ispitivanja omogućava da se donese zaključak o klasifikaciji, pri čemu se u obzir uzima klasifikacija ispitivane supstance u jednu od niza klasa toksičnosti koje su definisane po fiksnim LD50 graničnim vrednostima.

*1.4. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.4.1. Izbor životinjske vrste**

Preporučena vrsta glodara je pacov, iako se za ispitivanja koriste i druge životinjske vrste. Najčešće se koriste ženke**9** jer je na osnovu literature koja se odnosi na ispitivanje LD50 uočeno da je mala razlika u osetljivosti polova pri primeni ove metode. U slučajevima u kojima je uočena razlika, ženke su pokazale nešto veću osetljivost**11**. Ako se u literaturi nađu toksikološki ili toksikokinetički podaci za strukturno slične hemikalije koji ukazuju na to da su mužjaci osetljiviji na određenu ispitivanu supstancu, koriste se mužjaci za ispitivanje. Kad se ispitivanje izvodi na mužjacima, navodi se opravdanost za njihovu primenu.

Ispitivanje se izvodi na zdravim mladim jedinkama onih laboratorijskih sojeva koji se uobičajeno koriste u ovakvim ispitivanjima. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Svaka životinja na početku eksperimenta i primene prvih doza ispitivane supstance treba da bude stara između 8 i 12 nedelja, a njena telesna masa da bude u opsegu ± 20% od srednje vrednosti mase prethodno doziranih životinja.

**1.4.2. Uslovi smeštaja i ishrana**

Temperatura prostorije u kojima se drže životinje je 22° C (± 3° C). Relativna vlažnost vazduha iznosi najmanje 30%, ali ne više od 70% (osim kad se prostorije čiste), a idealno je vlažnost vazduha održavati između 50% i 60%. Osvetljenje je veštačko, i to u intervalima od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Za ishranu se može primenjivati uobičajena hrana za laboratorijske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće. Životinje se prema primenjenoj dozi ispitivane supstance mogu grupisati u kaveze. Broj životinja po kavezu ne sme ni na koji način da ometa proces praćenja i posmatranja svake životinje.

**1.4.3. Priprema životinja**

Životinje se biraju nasumce, obeležavaju radi lakšeg razlikovanja, a da bi se prilagodile na laboratorijske uslove drže se u kavezima najmanje pet dana pre početka eksperimenta i primene prve doze ispitivane supstance.

**1.4.4. Priprema doza**

Ispitivane supstance primenjuju se u konstantnim zapreminama, pa je neophodno prilagođavanje koncentracije za pripremanje različitih doza. Pri ispitivanju hemikalije u tečnom stanju, primena nerazblažene ispitivane supstance, odnosno supstance koja je u smeši u konstantnoj koncentraciji, može da bude značajna kasniju procenu rizika od te supstance. Maksimalna pojedinačna zapremina doze ne sme da se prekorači. Maksimalna zapremina tečnosti koja sme da se primeni zavisi i od veličine eksperimentne životinje. Zapremina ispitivane supstance koja se primenjuje kod glodara ne sme da prelazi 1 ml/100g TM životinje, a ukoliko se primenjuje vodeni rastvor može se razmotriti i doza od 2 ml/100g TM životinje. Kad je reč o formulaciji i pripremi doze, prvenstveno se preporučuje primena vodenog rastvora/suspenzije/emulzije, a zatim rastvora/suspenzije/emulzije u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za sve vehikulume osim vode, neophodno je znati njihove toksikološke karakteristike. Doze se pripremaju neposredno pre primene, osim ako se radi o supstanci za koju je poznato da je stabilna u rastvoru tokom dužeg vremenskog perioda.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Primena doza**

Ispitivana supstanca primenjuje se u jednoj dozi sondom direktno u želudac ili intubiranjem kanilom. U posebnim okolnostima, kada jednokratna doza nije moguća, ispitivana supstanca može se primeniti u nekoliko manjih porcija tokom vremenskog perioda koji nije duži od 24 sata.

Pre početka primene doza ispitivane supstance potrebno je izgladneti životinje (npr. pacovima je potrebno uskratiti hranu ali ne i vodu preko noći; miševima je potrebno uskratiti hranu ali ne i vodu na 3 do 4 sata). Nakon perioda gladovanja, potrebno je izmeriti telesnu masu životinja i primeniti ispitivanu supstancu. Nakon prve doze, hrana može ponovno da se uskrati, i to: kod pacova narednih 3 do 4 sata, a kod miševa naredna 1 do 2 sata. Kada se doza ispitivane supstance primeni u nekoliko manjih porcija u određenom vremenskom intervalu, može da se ukaže potreba za hranom i vodom ukoliko se radi o produženom vremenskom periodu.

**1.5.2. Broj životinja i dozni nivoi**

U svakom koraku koriste se po tri životinje. Dozni nivo koji će se koristiti kao početna doza jeste jedna od fiksnih doza od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg TM. Početni dozni nivo jeste doza koja sa najvećom verovatnoćom izaziva smrt kod nekih od uključenih životinja. Dijagrami toka ispitivanja koji su dati u Delu drugom ove metode, opisuju postupak koji se prati pri primeni svake početne doze. U Delu osmom ove metode date su smernice za klasifikaciju prema Pravilniku o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda ("Službeni glasnik RS", br. 59/10, 25/11 i 5/12), dok ne počne sa primenom Pravilnika o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN ("Službeni glasnik RS", br. 64/10 i 26/11).

Ukoliko dostupni podaci ukazuju da pri primeni najviše početne doze (2.000 mg/kg TM) verovatno neće doći do smrti životinja, obavlja se ispitivanje granične doze. Kad nema podataka o ispitivanoj supstanci, preporučeno je, zbog dobrobiti životinja, da početna doza bude od 300 mg/kg TM.

Vremenski razmak između primene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou određen je početkom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Tretman životinja sledećom dozom odlaže se sve dok se ne uverimo u preživljavanje prethodno tretiranih životinja.

Izuzetno, i samo u slučajevima kada to opravdavaju specifične potrebe, može da se razmotri primena dodatnog doznog nivoa od 5.000 mg/kg TM (videti Deo sedmi ove metode). Zbog dobrobiti životinja, ne preporučuje se ispitivanje na životinjama radi klasifikacije ispitivane supstance u Kategoriju 5 (prema GHS-u) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5000 mg/kg, i razmatra se samo u slučajevima kada postoji velika verovatnoća da će rezultati ispitivanja imati neposredan značaj za zaštitu zdravlja ljudi, životinja i životne sredine.

**1.5.3. Ispitivanje granične doze**

Ispitivanje granične doze primarno se koristi u situacijama kada istraživač ima pouzdane podatke da je ispitivana hemikalija netoksična, tj. da postaje toksična samo iznad propisanih graničnih doza. Podaci o toksičnosti ispitivanih hemikalija mogu se preuzeti iz završenih ispitivanja na sličnim hemikalijama, ako se uzme u obzir identitet i procenat komponenata za koje se pouzdano zna da su toksikološki značajne. U slučajevima gde nema podataka o toksičnosti ili ih nema dovoljno, ili kada se očekuje da će ispitivana hemikalija biti toksična, potrebno je isplanirati i obaviti glavno ispitivanje.

Ispitivanje granične doze, pri doznom nivou od 2.000 mg/kg TM, može se sprovesti na šest životinja (tri životinje po koraku) ili, izuzetno, pri doznom nivou od 5.000 mg/kg TM uvođenjem tri životinje po koraku (videti Deo sedmi ove metode). Ukoliko se pokaže da je smrt životinja povezana sa primenom ispitivane supstance potrebno je da se sprovede dalje ispitivanje i pri nižem doznom nivou.

*1.6. POSMATRANJA*

Životinje se posmatraju pojedinačno nakon primene prve doze ispitivane supstance i to najmanje jednom tokom prvih 30 minuta i periodično tokom sledeća 24 sata, uz posebnu pažnju i naglasak na prva 4 sata. Posmatranja se zatim obavljaju jednom dnevno, u periodu od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno isključiti iz ispitivanja (ako je pronađena mrtva) ili je lišiti života na human način imajući u vidu dobrobit životinje. Trajanje posmatranja ne sme da bude strogo definisano, već ga određuju toksični efekti, početak i trajanje oporavka, a ukoliko postoji potreba može i da se produži. Važni su periodi u kojima se pojavljuju i nestaju prvi znaci toksičnosti, posebno ako se znaci toksičnosti javljaju odloženo**12**. Sva posmatranja sistematski se beleže, a za svaku životinju potrebno je voditi zasebni karton sa opažanjima.

Ako životinje neprekidno pokazuju znakove toksičnosti, potrebna su dodatna posmatranja. Potrebno je uključiti i promene na koži i krznu, očima i mukoznim membranama, kao i na respiratornom, cirkulatornom, autononomnom i centralnom nervnom sistemu, promene somatomotorne aktivnosti i promene ponašanja. Posebna pažnja se obraća na pojavu tremora, konvulzija, salivacije, proliva, letargije, pospanosti i kome. Za definisanje ovih stanja koriste se principi i kriterijumi koji su dati u literaturi**9**. Životinje pronađene na samrti ili one koje trpe jak bol ili stres, lišavaju se života na human način. Kada su životinje lišene života iz humanih razloga ili pronađene mrtve, potrebno je što preciznije zabeležiti vreme smrti.

**1.6.1. Telesna masa**

Individualna telesna masa životinja određuje se neposredno pre primene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno nakon tog perioda. Beleže se i izračunavaju i promene u telesnoj masi. Na kraju ispitivanja meri se telesna masa preživelih životinja, a potom se lišavaju života na human način.

**1.6.2. Patološka ispitivanja**

Sve ispitivane životinje (uključujući i one koje uginu za vreme ispitivanja ili su isključene iz ispitivanja zbog dobrobiti životinje) potrebno je postmortalno pregledati. Sve značajne patološke promene beleže se za svaku životinju. Mikroskopskim pregledom organa mogu se dobiti korisni podaci, pa je potrebno obaviti pregled organa koji su postmortalnim pregledom pokazali značajne patološke promene i to kod onih životinja koje su preživele 24 ili više sati nakon prve doze.

**2. PODACI**

Potrebno je prikupiti podatke za svaku životinju. Svi podaci se tabelarno prikazuju, a za svaku ispitivanu grupu navodi se ukupan broj životinja u grupi, broj životinja koje su pokazale znakove toksičnosti, broj životinja koje su pronađene mrtve ili broj onih koje se lišavaju života na human način tokom ispitivanja, vreme smrti pojedinačnih životinja, opis i vremenski tok toksičnih efekata i njihovu reverzibilnost, kao i nalaze postmortalnog pregleda.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

PISANJE IZVEŠTAJA

Izveštaj sadrži:

1. Podatke o ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, čistoća, i kada je značajno, fizička i hemijska svojstva (uključujući izomerizaciju);

- identifikacione podatke, koji uključuju i CAS broj.

2. Podatke o vehikulumu (ako je značajno):

- obrazloženje za izbor vehikuluma, ukoliko nije voda.

3. Podatke o eksperimentalnoj životinji:

- vrsta/soj;

- mikrobiološki status životinje, ako je poznat;

- broj, starost i pol životinja (uključujući, kada je značajno, obrazloženje ukoliko se koriste mužjaci umesto ženki);

- izvor, uslove smeštaja, ishrane, itd.

4. Podatke o uslovima ispitivanja:

- detalje o formulaciji ispitivane supstance, uključujući fizičko stanje u kome je primenjena formulacija;

- detalje o primeni ispitivane supstance koji uključuju zapremine doza i vreme primene doze ispitivane supstance;

- detalje o kvalitetu hrane i vode (uključujući detalje o vrsti i izvoru hrane i izvoru vode);

- obrazloženje za izbor početne doze.

5. Rezultate:

- tabelarni prikaz rezultata i primenjene doze za svaku životinju (životinje koje pokazuju znakove toksičnosti uključujući smrtnost, prirodu, intenzitet i trajanje toksičnih efekata);

- tabelarni prikaz telesne mase i promena telesne mase;

- individualnu telesnu masu životinja na dan primene doze ispitivane supstance, zatim u nedeljnim intervalima, i u vreme uginuća ili lišavanja života na human način;

- datum i vreme smrti, ako do nje dođe pre predviđenog lišavanja života na human način;

- vremenski dijagram pojave znakova toksičnosti, kao i da li su znakovi bili reverzibilni za svaku životinju;

- nalaze postmortalnih pregleda i histopatološke nalaze za svaku životinju, ukoliko su dostupni.

6. Diskusiju i tumačenje rezultata.

7. Zaključke.

**4. LITERATURA**

1. Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

3. Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

4. Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

5. Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.

6. Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method - An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

7. Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

8. OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

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

11. Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

12. Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

**Deo drugi**

**POSTUPCI ZA POČETNE DOZE**

OPŠTE NAPOMENE

U ovom delu date su sheme ispitivanja za svaku početnu dozu:

- Deo treći: Početna doza je 5 mg/kg TM

- Deo četvrti: Početna doza je 50 mg/kg TM

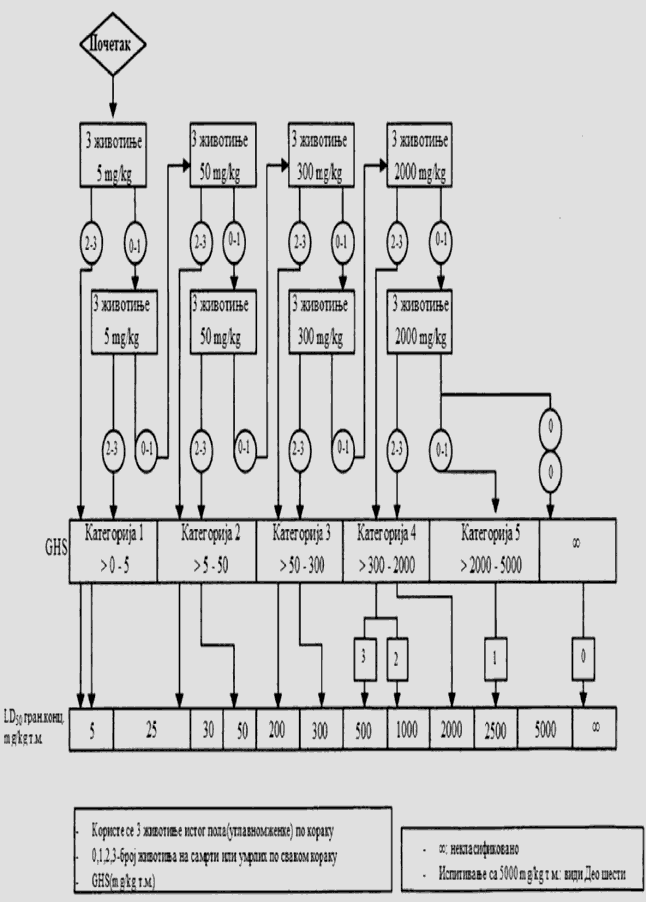
- Deo peti: Početna doza je 300 mg/kg TM

- Deo šesti: Početna doza je 2000 mg/kg TM

U zavisnosti od broja životinja koje su lišene života na human način postupak ispitivanja označen je strelicama.

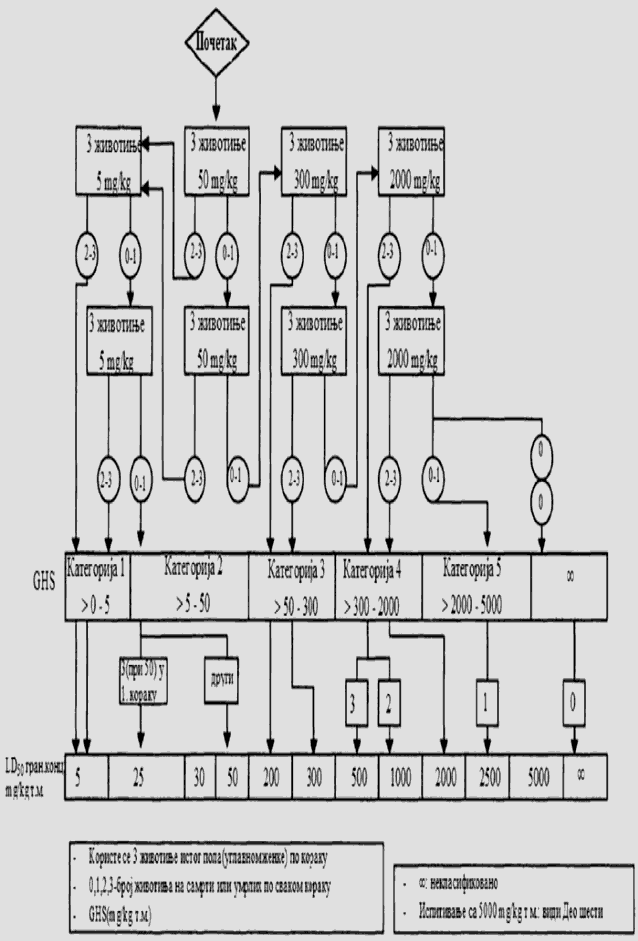
**Deo treći**

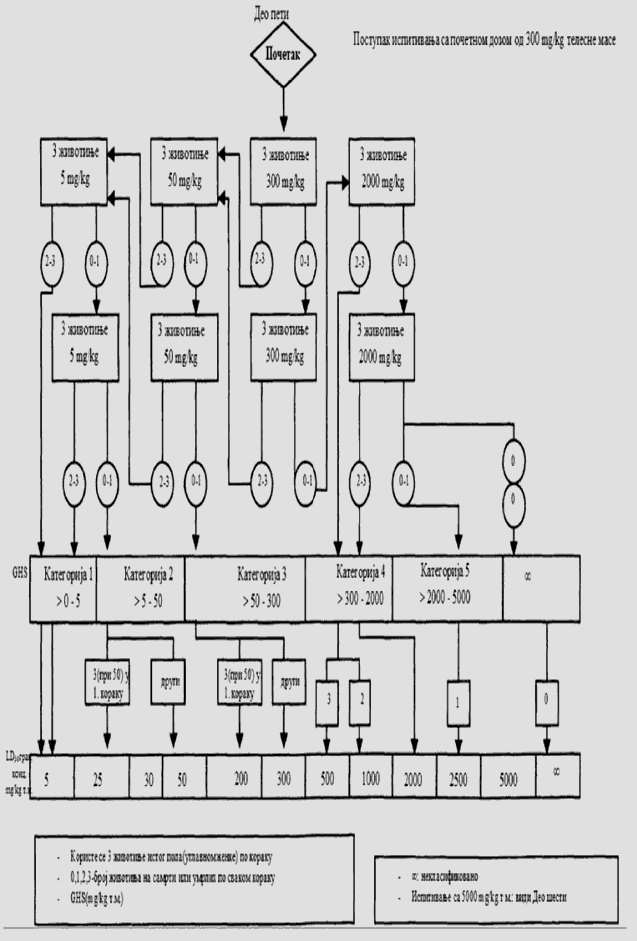
**POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 5 MG/KG TELESNE MASE**



**Deo četvrti**

**POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 50 MG/KG TELESNE MASE**





**Deo sedmi**

**KRITERIJUMI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH SUPSTANCI SA OČEKIVANIM VREDNOSTIMA LD50 IZNAD 2.000 mg/kg ZA KOJE NIJE POTREBNO DODATNO ISPITIVANJE**

Kriterijum za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorija 5 (po GHS-u) omogućava identifikovanje ispitivanih supstanci koje pokazuju nisku akutnu toksičnost, ali koje pod određenim okolnostima mogu da predstavljaju opasnost za osetljive populacije. Ove supstance imaju vrednosti LD50 (peroralno) i LD50 (dermalno) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg ili potpuno odgovarajućih doza primenjenih drugim putevima unosa. Ispitivane supstance klasifikuju se u odgovarajuću kategoriju opasnosti (Kategorija 5 po) ako je: 2.000 mg/kg < LD50 < 5.000 mg/kg, u sledećim slučajevima:

a) ako bilo koja od shema ispitivanja datih u Delovima trećem, četvrtom, petom i šestom ove metode upućuje na ovu kategoriju zbog učestalosti smrtnih slučajeva,

b) ako postoje pouzdani dokazi da je vrednost LD50 u opsegu vrednosti koji odgovara kategoriji 5; ili ako druge studije toksičnosti sprovedene na životinjama ili ljudima ukazuju na potencijalne akutne toksične efekte na zdravlje ljudi,

v) ako se ekstrapolacijom, procenom ili merenjem podataka ne ustanovi pripadnost nekoj višoj klasi opasnosti, a:

- postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajne toksične efekte kod ljudi ili

- se uoči smrt pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, peroralnom primenom odgovarajuće doze ili

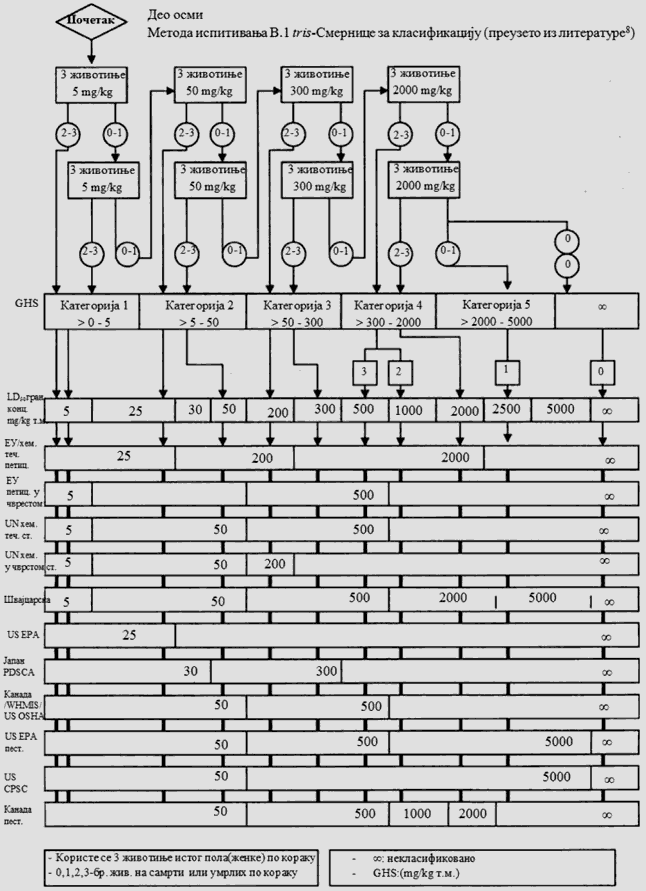
- se stručnom procenom potvrde značajni klinički znakovi toksičnosti, pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, pri čemu klinički znakovi ne uključuju proliv, piloerekciju ili zapušteni izgled ili

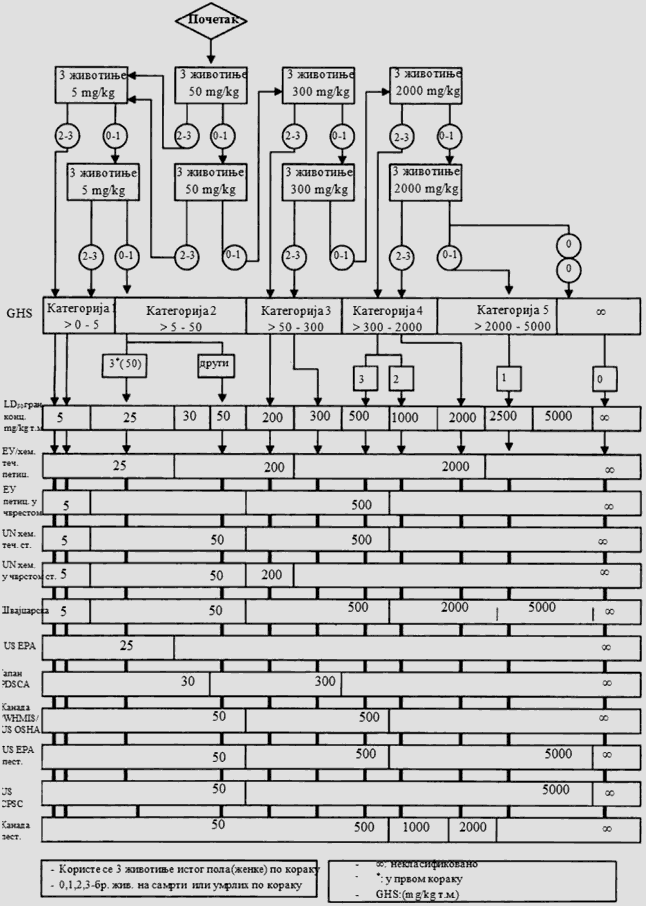
- se stručnom procenom potvrdi postojanje značajnih akutnih toksičnih efekata iz drugih ispitivanja sprovedenih na životinjama.

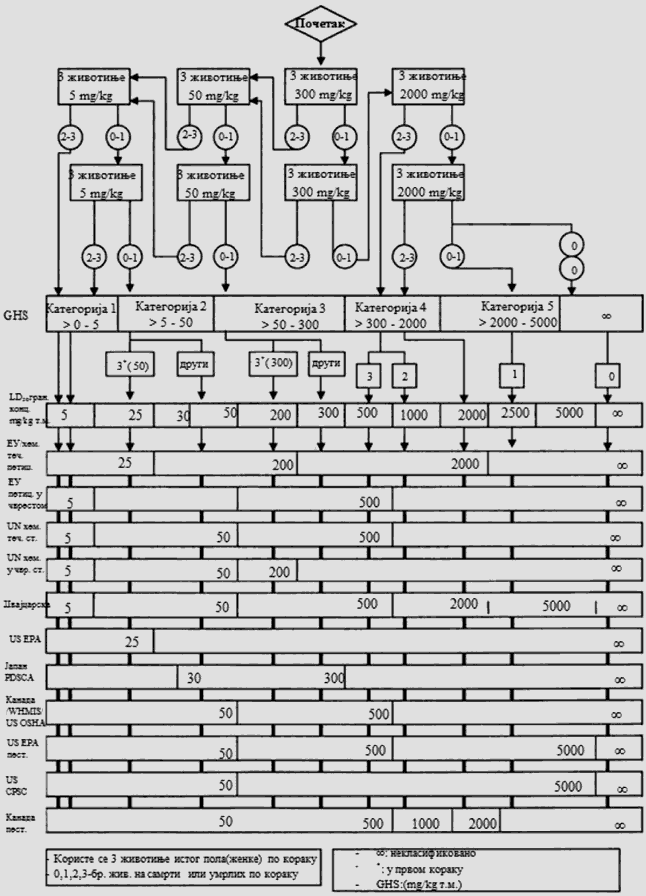
ISPITIVANJE DOZA IZNAD 2.000 mg/kg

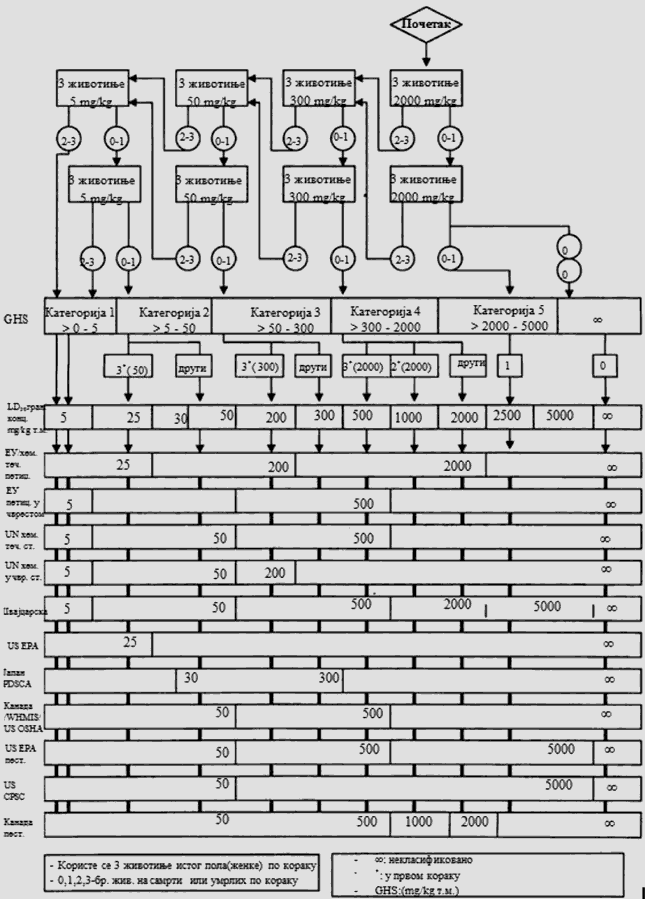
Zbog zaštite životinja i njihove dobrobiti ne preporučuje se ispitivanje doze od 5.000 mg/ kg za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorija 5 (po GHS-u). Primena ove doze razmatra se samo u slučajevima kad postoji velika verovatnoća da će rezultati ispitivanja imati značajan doprinos zaštiti zdravlja ljudi ili životinja**10**. Dalja ispitivanja sa primenom visokih doza se ne izvode.

Kada se ispituje doza od 5.000 mg/kg dovoljan je samo jedan korak (npr. tri životinje). Ako ugine prva životinja kojoj se primenjuje ispitivana supstanca, doza se spušta na 2.000 mg/kg prema pravilima datim u shemi iz Dela drugog ove metode. Ako prva životinja preživi, u ispitivanje se uključuju dodatne dve životinje. Ako ugine samo jedna od tri životinje, pretpostavlja se da je vrednost LD50 iznad 5.000 mg/kg. Ako uginu dve životinje, nastavlja se primena ispitivane supstance u dozi od 2.000 mg/kg.









**B.2. AKUTNA INHALACIONA TOKSIČNOST**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Korisno je imati prethodne podatke o svojstvima supstance kao što su: raspodela, veličina čestica, pritisak pare, tačka topljenja, tačka ključanja, tačka paljenja i eksplozivnost (ako se radi o eksplozivnoj supstanci).

Videti Opšti uvod, Deo A.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod, Deo B.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Nekoliko grupa eksperimentalnih životinja izlaže se ispitivanoj supstanci koja se primenjuje u rastućim koncentracijama kroz definisani vremenski period, tako da se na jednu grupu životinja primenjuje jedna koncentracija. Beleže se zapažanja o efektima primenjenih koncentracija i smrtnost kod životinja. One životinje koje uginu za vreme ispitivanja post-mortalno se pregledaju. Po završetku ispitivanja i preživele životinje se lišavaju života na human način i post-mortalno pregledaju.

One životinje koje pokazuju teške i trajne znake toksičnosti i bola lišavaju se života na human način. Izbegava se primena ispitivane supstance u koncentracijama za koje se pouzdano zna da će kod životinja usled korozivnog ili jakog iritativnog svojstva izazvati značajan bol i patnju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Životinje se čuvaju u odgovarajućim uslovima smeštaja i ishrane prema definisanom režimu najmanje pet dana pre početka eksperimenta. Zdrave mlade životinje nasumce se razvrstavaju u prethodno definisani broj grupa. Nije potrebno da se životinje podvrgnu simuliranom izlaganju, osim ako to nije posebno navedeno u uputstvu za aparaturu za inhalaciono izlaganje.

Čvrste ispitivane supstance usitnjavaju se do čestica odgovarajuće veličine.

Kada je neophodno, dodaje se vehikulum kojim se postiže odgovarajuća koncentracija ispitivane supstance u atmosferi. Za dodati vehikulum postavlja se i kontrolna grupa. Odabrani vehikulum i drugi aditivi koji se koriste da olakšaju primenu ispitivane supstance ne smeju da izazivaju toksične efekte. Ako je potrebno mogu se koristiti podaci iz literature.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Ako ne postoje kontraindikacije, preporučena vrsta je pacov i to sojevi koji se najčešće koriste u laboratorijskim ispitivanjima. Za oba pola, na početku ispitivanja, opseg u kome se kreće telesna masa životinja ne sme da prelazi ± 20% od srednje vrednosti.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Najmanje 10 glodara (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaku ispitivanu koncentraciju. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne.

Napomena: U ispitivanjima akutne toksičnosti na životinjama višeg reda od glodara, može se razmotriti i korišćenje manjeg broja jedinki. Doze se pažljivo biraju, uz nastojanje da se izbegnu doze koje su veće od srednjih toksičnih doza. U ovakvim ispitivanjima se ne primenjuju letalne doze ispitivane supstance.

*1.6.2.3. Koncentracije izlaganja*

Koristi se najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, a njihov izbor pokriva opseg toksičnih efekata i stope smrtnosti. Podaci omogućavaju konstruisanje krive zavisnosti koncentracije i smrtnosti, i gde je moguće, određivanje vrednosti LC50.

*1.6.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ako se pet mužjaka i pet ženki izlože koncentraciji od 20 mg/L gasa ili 5 mg/L aerosola ili čestica u trajanju od četiri sata (ili se izlože maksimalnoj mogućoj koncentraciji, kada nije moguće postići ovu koncentraciju zbog fizičkih i hemijskih svojstava uključujući eksplozivna svojstva ispitivane supstance) i pri tome tokom 14 dana ne dođe do smrtnih slučajeva, dalja ispitivanja se obustavljaju.

*1.6.2.5. Vreme izlaganja*

Vreme izlaganja je četiri sata.

*1.6.2.6. Oprema*

Životinje se podvrgavaju ispitivanju pomoću opreme koja je dizajnirana tako da omogući dinamički protok vazduha sa najmanje 12 potpunih izmena u jednom satu, kako bi se omogućila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnomeran raspored u atmosferi. Kada se koristi komora, ona je dovoljno prostrana za životinje i da omogući maksimalnu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Opšte pravilo koje obezbeđuje stabilnost atmosfere u komori, jeste da ukupna "zapremina" životinja na koje se primenjuje ispitivana supstanca nije bude veća od 5% ukupne zapremine komore. Koriste se različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost čitavog tela, samo glave ili samo oro-nazalnih otvora životinje. Poslednje dve komore minimiziraju izloženost ispitivanoj supstanci pri drugim putevima unosa.

*1.6.2.7. Vreme posmatranja*

Posmatranja se obavljaju u trajanju od najmanje 14 dana. Ovaj vremenski interval nije fiksno određen. Njega određuju, između ostalog, toksični efekti, njihova učestalost, kao i vreme trajanja oporavka. Vreme posmatranja se, po potrebi, može i produžiti. Važno je zabeležiti vreme kod kojeg se jave ili nestanu prvi znaci toksičnosti, kao i vreme smrti, pogotovo ako postoji tendencija da vreme smrti bude odloženo.

**1.6.3. Postupak**

Neposredno pre nego što se eksperimentalna životinja izloži ispitivanoj supstanci meri se njena telesna masa. Životinje se u periodu od četiri sata izlažu ispitivanim koncentracijama u komorama koje su prethodno uravnotežene. Vreme potrebno za uravnoteženje koncentracija u komori je kratko. Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje održava se na 22° C ± 3° C, a relativna vlažnost između 30% i 70%. U nekim slučajevima (npr. kod ispitivanja aerosola) ovo nije izvodljivo. Održavanjem negativnog pritiska unutar komore (≥ 5 mm vode) sprečiće se curenje isparavane supstance u okolnu zonu. Za vreme izlaganja ispitivanoj supstanci životinjama ne sme da se daje hrana i voda. U toku eksperimenta se koriste odgovarajući sistemi za održavanje i praćenje uslova unutar komore. Sistem omogućava stabilne uslove i njihovo uspostavljanje u što kraćem vremenskom roku. Komora mora da bude dizajnirana na takav način da omogućava homogenu distribuciju atmosfere za vreme ispitivanja.

Mere se i prate sledeći parametri:

a) brzina protoka vazduha (neprekidno);

b) koncentracije ispitivane supstance u inhalacionoj zoni najmanje tri puta tokom izlaganja životinja (aerosoli na visokim temperaturama zahtevaju i češće praćenje). Tokom perioda izlaganja ispitivanoj supstanci, koncentracije ne smeju da variraju više od ± 15% od srednje vrednosti. Kod aerosola teško se postiže ovaj nivo kontrole, pa se u tom slučaju tolerišu veće razlike u vrednostima. Za aerosole je potrebno obaviti i analizu veličine čestica (najmanje jedanput u svakoj grupi životinja);

v) temperatura i vlažnost (neprekidno, ako je moguće).

Zapažanja se beleže sistematično za vreme i nakon izlaganja ispitivanoj supstanci, i za svaku životinju vodi se zaseban karton. Prvog dana zapažanja se češće beleže. Pažljivi klinički pregled životinje potrebno je uraditi najmanje jedanput svakog radnog dana, a preostala posmatranja beleže se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih aktivnosti kojima se na najmanju meru svodi gubitak životinja iz studije. Na uginulim životinjama radi se post-mortalni pregled ili se one odlažu na hlađenje, a životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe ili se lišavaju života na human način.

Beleže se promene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, respiratornom, cirkulatornom, autononomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Posebna pažnja se posvećuje načinu disanja, tremoru, konvulzijama, salivaciji, prolivu, letargiji, pospanosti i komi kod životinja. Vreme smrti beleži se što preciznije. Telesna masa svake pojedinačne životinje određuje se jednom nedeljno nakon prvobitnog izlaganja ispitivanoj supstanci, kao i u vreme smrti (lišavanja života na human način). Životinje koje uginu za vreme ispitivanja i one koje prežive do samog kraja post-mortalno se pregledaju sa posebnom pažnjom na promene u gornjem i donjem respiratornom traktu. Sve značajnije patološke promene se beleže. Kada je neophodno, uzimaju se i uzorci tkiva za histopatološka ispitivanja.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu grupu životinja navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, vreme smrti za svaku životinju, broj onih koje su pokazale znakove toksičnosti, opis toksičnih efekata i nalazi post-mortalnog pregleda. Kada životinje prežive duže od jednog dana izračunavaju se i beleže promene u njihovoj telesnoj masi. Životinje koje se lišavaju života na human način, zbog intenziteta izazvanog efekta ili bola, navode se kao uginuća izazvana delovanjem supstance. Vrednost LC50 određuje se primenom jedne od standardnih metoda ispitivanja.

Procena podatka uključuje i potencijalnu povezanost između izloženosti životinje ispitivanoj supstanci i učestalosti pojave i težine uočenih abnormalnosti. Navode se i promene u ponašanju, kliničke promene, pojava većih oštećenja, promene telesne mase, smrtnost, kao i drugi toksični efekti.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

*3.1. PISANJE IZVEŠTAJA*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

1) Eksperimentalnoj životinji:

- vrsta, soj, izvor, uslovi smeštaja, ishrana itd.

2) Uslovima ispitivanja:

- opis aparature za inhalaciono izlaganje koja podrazumeva: dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za stvaranje aerosola, metodu za kondicioniranje vazduha i način smeštaja životinja u komori kada se koristi. Opisuje se i aparatura za merenje temperature, vlažnosti, koncentracije aerosola i određivanje raspodele veličine čestica.

3) Izlaganju ispitivanoj supstanci:

Ovi podaci navode se tabelarno zajedno sa srednjim vrednostima i merama odstupanja (standardna devijacija), a, ako je moguće, uključuju i podatke o:

a) brzini protoka vazduha, opremi za inhalaciju;

b) temperaturi i vlažnosti vazduha;

v) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance u opremi za inhalaciju, podeljenom sa zapreminom vazduha);

g) prirodi vehikuluma, ako je korišćen;

d) tačnoj koncentraciji supstance u zoni udisanja;

đ) prosečnom aerodinamičkom prečniku (The mass median aerodynamic diameter, MMAD) i geometrijskoj standardnoj devijaciji (The geometric standard deviation, GSD);

e) vremenu predviđenom za postizanje ravnoteže u komori;

ž) vremenu izlaganja;

4) Rezultatima:

- tabelarni prikaz podataka podeljenih prema polu i nivou izloženosti (broj mrtvih životinja ili životinja lišenih života na human način tokom trajanja ispitivanja; broj životinja koje su pokazale znake toksičnosti; broj izloženih životinja, itd);

- vreme smrti za vreme ili nakon izlaganja, razlozi i kriterijumi za usmrćivanje životinja na human način;

- sva opažanja;

- LC50 vrednosti za svaki pol određene na kraju perioda posmatranja (sa propisanom metodom izračunavanja);

- 95% interval pouzdanosti za LC50 vrednosti (gde je moguće);

- kriva zavisnosti doza/smrtnost i nagib (ukoliko to omogućava metoda određivanja);

- nalazi post-mortalnih pregleda;

- svi histopatološki nalazi;

- obrazloženje rezultata (posebna pažnja se posvećuje uticaju koje može imati lišavanje života životinja iz humanih razloga za vreme ispitivanja na izračunatu vrednost LC50);

- tumačenje rezultata.

*3.2. PROCENA PODATAKA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod, Deo G.

**4. LITERATURA**

Videti opšti uvod, Deo D.

**B.3. AKUTNA DERMALNA TOKSIČNOST**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti opšti uvod, Deo A.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti opšti uvod, Deo B.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se na kožu kod više grupa životinja, u rastućim dozama, tako da se jednoj grupi životinja primenjuje jedna doza. Nakon toga posmatraju se efekti primenjenih doza i beleži broj uginulih životinja. Životinje koje uginu tokom ispitivanja post-mortalno se pregledaju. Na kraju ispitivanja i preživele životinje se lišavaju života na human način i post-mortalno pregledaju.

Životinje koje pokazuju izrazite znakove patnje i bola, lišavaju se života na human način. Izbegava se primena ispitivane supstance u koncentracijama za koje se pouzdano zna da će kod životinja izazvati znatan bol i patnju usled iritacije ili korozivnog efekta.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Životinje se drže u eksperimentalnim kavezima i hrane se po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana pre početka ispitivanja. Zdrave mlade životinje nasumce se dele u prethodno definisani broj grupa. Približno 24 sata pre početka ispitivanja životinjama se uklanja krzno brijanjem dorzalnog dela tela. Kod šišanja ili brijanja krzna potrebno je obratiti pažnju da se ne ozledi koža jer bi to moglo da utiče na njenu permeabilnost (propustljivost). Za primenu ispitivane supstance potrebno je da se pripremi najmanje 10% od ukupne površine kože životinje. Ako se ispituje čvrsta supstanca, koja se po potrebi može usitniti do praha, dobijeni prašak potrebno je dobro ovlažiti vodom ili nekim drugim vehikulomom kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Ako se koristi određeni vehikulum, uzima se u obzir i njegov uticaj na penetraciju (prodiranje) ispitivane supstance kroz kožu. Ispitivane supstance koje se već nalaze u tečnom obliku najčešće se koriste nerazblažene.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Za ispitivanje najčešće se koriste kunići ili pacovi. I druge vrste životinja mogu da se koriste ali to zahteva dodatno obrazloženje, budući da se preporučuju već ustaljene životinjske vrste. Na početku ispitivanja, opseg telesne mase životinja za svaki pol ne sme da prelazi ± 20% od odgovarajuće srednje vrednosti.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Najmanje pet životinja koristi se za svaki dozni nivo. Sve životinje su istog pola. Ako se koriste ženke, ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako postoje podaci na osnovu kojih je pokazano da je određeni pol osetljiviji kod ovakvih ispitivanja, koristi se taj pol.

Napomena: U ispitivanjima akutne toksičnosti na životinjama višeg reda od glodara, može da se razmotri i korišćenje manjeg broja životinja. Doze se pažljivo biraju, i ne koriste se doze veće od srednje toksičnih doza. U ovakvim ispitivanjima izbegavaju se letalne doze ispitivane supstance.

*1.6.2.3. Dozni nivoi*

Koristi se najmanje tri doze ispitivane supstance, a njihov izbor je takav da kod ispitivane grupe životinja izazove čitav opseg toksičnih efekata i smrtnost. Kod određivanja primenjenih doza, uzimaju se u obzir potencijalni iritativni i korozivni efekti. Vodi se računa i o količini dobijenih podataka kako bi se mogla konstruisati kriva doza/odgovor, a gde je to moguće, određuje se i vrednost LD50.

*1.6.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ispitivanje granične doze pri jednom doznom nivou može da se izvodi primenom ispitivane supstance od 2.000 mg/kg TM na grupi od pet mužjaka i pet ženki, prema postupku koji je opisan u Metodi ispitivanja B.1*bis*., Deo prvi odeljak 1.5.3. Ako dođe do smrti usled primene navedene doze ispitivane supstance, razmatra se cela studija.

*1.6.2.5. Period posmatranja*

Period posmatranja traje najmanje 14 dana. Ovaj vremenski period nije strogo određen. Njega određuju, između ostalog, toksične reakcije, njihova učestalost, kao i vreme trajanja oporavka. Vreme posmatranja može da se produži. Važno je da se zabeleži vreme pojave ili nestanka prvih znakovi toksičnosti, kao i vreme smrti, pogotovo ako se primeti da je vreme smrti odloženo.

**1.6.3. Postupak**

Životinje se drže u kavezima za pojedinačno i odvojeno držanje. Ispitivana supstanca primenjuje se ravnomerno preko površine koja iznosi otprilike 10% od ukupne površine kože. Za primenu veoma toksičnih supstanci, izložena površina može da bude i manja, ali je u tom slučaju potrebno voditi računa da se primenjeni sloj ravnomerno rasporedi u što tanjem sloju.

Ispitivana supstanca drži se u kontaktu sa kožom tokom 24 sata pomoću porozne gaze na koju se nanosi, pri čemu se gaza ljepljivom trakom-flasterom prilepi na kožu životinje. Mesto primene dodatno se može prekriti kako bi se osiguralo da ispitivana supstanca ne dođe u kontakt sa ustima životinje. Ako je neophodno, na životinju se mogu staviti i dodatni štitnici kojima se sprečava peororalno unošenje ispitivane supstance. Ne preporučuje se potpuna imobilizacija životinje.

Nakon propisanog vremena izlaganja ispitivanoj supstanci, uklanja se višak ispitivane supstance ili vodom gde je to moguće ili nekim drugim odgovarajućim načinom za čišćenje kože.

Zapažanja se beleže sistematično. Za svaku životinju vodi se zasebni karton. Prvog dana zapažanja se češće beleže. Pažljivi klinički pregled životinje potrebno je uraditi najmanje jedanput svakog radnog dana, a preostala posmatranja beleže se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih aktivnosti kojima se na najmanju meru svodi gubitak životinja iz studije. Na uginulim životinjama potrebno je uraditi pos-mortalni pregled ili se one odlažu na hlađenje, a životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe ili se lišavaju života na human način.

Beleže se promene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Posebna pažnja se posvećuje načinu disanja, tremoru, konvulzijama, salivaciji, prolivu, letargiji, pospanosti i komi kod životinja. Vreme smrti beleži se što preciznije. Životinje koje uginu za vreme ispitivanja i one koje ostanu žive do samog kraja post-mortalno se pregledaju. Sve značajnije patološke promene beleže. Kada postoje indikacije, uzimaju se i uzorci tkiva za histopatološka ispitivanja.

Procena toksičnosti kod suprotnog pola:

Po završetku studije u kojoj se koriste životinje samo jednog pola, ista doza ispitivane supstance primenjuje se na najmanje jednu grupu od pet životinja suprotnog pola da bi se utvrdilo da li suprotni pol pokazuje veću osetljivost pri primeni ispitivane supstance Može se razmotriti i korišćenje manjeg broja životinja, zavisno od okolnosti. Kada su dostupni odgovarajući podaci na osnovu kojih je pokazano da je pol životinja koje su odabrane u prvobitnom ispitivanju značajno osetljiviji na ispitivanu supstancu, izostavlja se ispitivanje na životinjama suprotnog pola.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu grupu životinja navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, vreme smrti za svaku životinju, broj onih koje su pokazale znakove toksičnosti, opis toksičnih efekata i nalaze post-mortalnog pregleda. Individualna telesna masa životinja meri se i beleži neposredno pre primene ispitivane supstance, zatim jednom nedeljno, i u vreme smrti. Kada životinje prežive duže od jednog dana izračunavaju se i beleže promene u njihovoj telesnoj masi. Životinje koje se lišavaju života na human način, zbog intenziteta patnje ili bola, navode se kao uginuća izazvana delovanjem supstance. Vrednost LD50 određuje se jednom od standardnih metoda ispitivanja.

Procena podatka uključuje i potencijalnu povezanost između izloženosti životinje ispitivanoj supstanci i učestalosti pojave i težine uočene abnormalnosti. Navode se promene u ponašanju, kliničke promene, pojava većih oštećenja, promene telesne mase, smrtnost kao i drugi toksični efekti.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

*3.1. PISANJE IZVEŠTAJA*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

1) Eksperimentalnoj životinji:

- vrsta, soj, izvor, uslovi smeštaja, ishrana itd.

2) Uslovima ispitivanja:

- način korišćen za čišćenje kože i tip obloga; okluzivni ili ne-okluzivni;

- dozni nivoi (koncentracija vehikuluma, ako je korišćen);

- pol eksperimentalnih životinja;

3) Rezultatima:

- tabelarni prikaz podataka koji su podeljeni prema polu i doznim nivoima (broj uginulih ili životinja lišenih života na human način tokom trajanja ispitivanja; broj životinja koje su pokazale znakove toksičnosti; broj izloženih životinja, itd.);

- vreme smrti nakon izlaganja, uzroci i kriterijumi za lišavanje života na human način;

- sva posmatranja;

- vrednost LD50 za onaj pol životinja koji je korišćen u ispitivanju, određen nakon 14 dana primenom propisane metode ispitivanja;

- 95% interval pouzdanosti za LD50 vrednosti (kada je moguće);

- kriva zavisnosti doza/smrtnost i nagib (kada metoda omogućava njeno konstruisanje);

- nalazi post-mortalnog pregleda;

- histopatološki nalazi;

- obrazloženje rezultata (posebna pažnja se posvećuje uticaju koje lišavanje života na human način za vreme ispitivanja može da ima na izračunatu vrednost LD50);

- tumačenje rezultata.

*3.2. PROCENA PODATAKA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod, Deo G.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod, Deo D.

**B.4. AKUTNA TOKSIČNOST: IRITACIJA/KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 404 (2002).

*1.1. UVOD*

U pripremi ažurirane verzije ove metode ispitivanja, posebna pažnja posvećena je mogućim poboljšanjima u odnosu na dobrobit životinja, kao i proceni svih postojećih podataka o ispitivanoj supstanci, sa ciljem da se izbegnu nepotrebna ispitivanja na životinjama. Metoda ispitivanja zasniva se na preporuci da se pre *in vivo* ispitivanja iritativnog ili korozivnog efekta supstance obavi analiza kvaliteta postojećih podataka. Kada nema dovoljno podataka, moguće ih je dobiti primenom ispitivanja korak po korak**1**. Strategija ispitivanja uključuje i izvođenje validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja koja su opisana u Delu trećem ove metode. Kada je prihvatljivo u inicijalnom *in vivo* ispitivanju, preporučuje se sukcesivna (jedan za drugim), a ne istovremena, primena tri "patch" testa na životinju.

U interesu naučne zasnovanosti i dobrobiti životinja jeste da se *in vivo* ispitivanja započinju tek nakon analize kvaliteta svih dostupnih podataka koji su relevantni za procenu potencijala supstance da izazove iritaciju/korozivno oštećenje. Takvi podaci obuhvataju: dokaze na osnovu nalaza kod ljudi odnosno iz prethodno sprovedenih studija na laboratorijskim životinjama, dokaze o efektima iritacije/korozivnog oštećenja za jednu ili više strukturno sličnih supstanci ili smeša takvih supstanci, podatke koji ukazuju na jaku kiselost ili baznost ispitivane supstance**2, 3**, ili podatke iz prethodno validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja**4, 5, 5a**. Ovakva analiza smanjiće potrebu za *in vivo* ispitivanjima iritacije/korozivnog oštećenja kože za one supstance za koje postoji dovoljno indirektnih dokaza na tom polju.

U Delu trećem ove metode opisana je strategija ispitivanja korak po korak koja uključuje i obavljanje validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože. Strategiju su razvili, kao jedinstveno prihvaćenu i preporučenu, članovi radne grupe OECD**6**, a prihvaćena je i uvršćena u preporučene strategije ispitivanja od strane Globalno harmonizovanog sistema za klasifikaciju i obeležavanje (u daljem tekstu: GHS)**7**. Preporučuje se praćenje ove strategije pre preduzimanja bilo kakvih *in vivo* ispitivanja. Za nove supstance koje još nisu bile ispitivane za prikupljanje podataka o njihovim iritativnim/korozivnim efektima za kožu preporučen je pristup ispitivanja "korak po korak". Za supstance koje su već uključene u ispitivanja, ista strategija se primenjuje za upotpunjavanje podataka o iritativnim/korozivnim efektima za kožu. Ukoliko se primeni drugačija strategija ispitivanja ili postupka, ili se odluči da se ne primeni ova metoda ispitivanja, potrebno je objasniti i obrazložiti razloge ovakve odluke.

Ako se određivanje iritativnih/korozivnih efekata ispitivane supstance na koži ne može utvrditi na osnovu analize kvaliteta postojećih podataka, u skladu sa strategijom ispitivanja korak po korak, potrebno je razmotriti obavljanje *in vivo* ispitivanja (videti Deo treći ove metode).

*1.2. DEFINICIJE*

Iritacija kože jeste nastanak reverzibilnih oštećenja kože koja prate primenu ispitivane supstance nakon izlaganja u trajanju od 4 sata.

Korozivno oštećenje kože jeste nastanak ireverzibilnih oštećenja kože odnosno vidljive nekroze u epidermisu i dermisu nakon četvoročasovne primene ispitivane supstance. Korozivno oštećenje kože karakteriše se prema tipu izazvanog oštećenja kao: ulkus, krvarenje ili krvave kraste i na kraju perioda posmatranja od 14 dana prema promeni boje kože uslovljene perutanjem i pojavi površina sa alopecijom i ožiljnog tkiva. U cilju procene nejasnih oštećenja obavljaju se histopatološka ispitivanja.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se u jednoj dozi na kožu eksperimentalne životinje, a netretirani delovi kože služe kao kontrola. Stepen iritativnih/korozivnih efekta na koži očitava se i ocenjuje u prethodno utvrđenim vremenskim intervalima, pri čemu se dodatno svaki efekat pojedinačno opisuje kako bi se dobila kompletna procena štetnih efekata. Studija traje dovoljno dugo, da bi mogli da se donesu zaključci o reverzibilnosti ili ireverzibilnosti zabeleženih štetnih efekata.

Životinje koje u bilo kom delu ispitivanja pokazuju stalne znakove patnje ili bola, lišavaju se života na human način, a supstanca se procenjuje u skladu sa tim. Kriterijumi za donošenje odluke o lišavanju života na human način onih životinja koje su na samrti i pokazuju znake izrazite patnje, opisani su u literaturi**8**.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Priprema za *in vivo* ispitivanje**

*1.4.1.1. Izbor životinjske vrste*

Preporučuje se korišćenje zdravih mladih jedinki albino kunića. Ukoliko se koristi druga životinjska vrsta, navode se razlozi za ovo korišćenje.

*1.4.1.2. Priprema životinja*

Približno 24 sata pre početka ispitivanja životinjama se uklanja krzno brijanjem dorzalnog dela tela. Kod brijanja krzna, potrebno je obratiti pažnju da se ne povredi koža jer se za ispitivanje koristite isključivo one životinje čija je koža neoštećena (intaktna).

Neke vrste kunića imaju gusto krzno na pojedinim delovima kože, zavisno od godišnjeg doba. Ispitivanje se ne vrši na ovim površinama kože.

*1.4.1.3. Uslovi smeštaja životinja i ishrana*

Životinje se smeštaju u odgovarajući smeštaj za pojedinačno i odvojeno držanje. Temperatura smeštajnog prostora u kome se drže kunići održava se na 20° C (± 3° C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30% i da ne prelazi 70% (osim u slučajevima kada se prostorija sa životinjama čisti). Idealna vlažnost je između 50% i 60%. Osvetljenje je veštačko i to u intervalima od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Životinje se hrane uobičajenom hranom za laboratorijske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće.

**1.4.2. Postupak**

*1.4.2.1. Primena ispitivane supstance*

Ispitivana supstanca nanosi se na malu površinu kože (otprilike 6 cm2) i prekriva gazom koja se fiksira pomoću flastera. U slučajevima kad direktno nanošenje nije moguće (npr. kod tečnosti ili nekih pasta), ispitivana supstanca se prvo nanosi na gazu, a zatim se gaza postavlja na kožu. Obloga od gaze je u laganom kontaktu s kožom, tako da bude polu zatvorena (semi-okluzivna) tokom perioda izlaganja. Ako se ispitivana supstanca nanosi na oblogu, a ne direktno na kožu, obloga se fiksira na kožu tako da se ostvari dobar kontakt i da se supstanca ravnomerno raspodeli po površini kože. Potrebno je onemogućiti pristup životinje oblozi, kao i inhalaciju ili dovođenje u kontakt sa ustima životinje (ingestiju) ispitivane supstance.

Ispitivane supstance koje se nalaze u tečnom stanju, najčešće se koriste nerazblažene. Ako se ispituje čvrsta supstanca, koja se po potrebi može usitniti do praha, dobijeni prašak potrebno je dobro ovlažiti u što manjoj zapremini vode ili nekom drugom vehikulumu kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Ako se koristi vehikulum koje nije voda, mogući uticaj tog vehikuluma na iritaciju kože svodi se na najmanju meru.

Nakon izlaganja, koje uobičajeno traje četiri sata, višak ispitivane supstance ispira se vodom ili se uklanja pomoću odgovarajućeg sredstva, bez promene efekata na koži i integriteta epidermisa.

*1.4.2.2. Dozni nivo*

Na pripremljeni deo kože nanosi se 0,5 mL tečne supstance ili 0,5 g čvrste supstance ili supstance u obliku paste.

*1.4.2.3. Inicijalno ispitivanje   
(in vivo ispitivanje iritacije/korozivnog oštećenja kože na jednoj životinji)*

Stroga je preporuka da se *in vivo* ispitivanje inicijalno izvodi samo na jednoj životinji, naročito ako se sumnja da bi ispitivana supstanca mogla da izazove korozivno oštećenje kože. Ova preporuka je u skladu sa strategijom ispitivanja korak po korak iz Dela trećeg ove metode. Kada je na osnovu analize kvaliteta podataka doneta stručna procena da je ispitivana supstanca korozivna, nisu neophodna dalja ispitivanja na životinjama. Za većinu supstanci za koje se sumnja da izazivaju korozivno oštećenje kože ne smatraju se neophodnim dalja *in vivo* ispitivanja. U slučajevima kada nema dovoljno dokaza, potrebni su dodatni podaci, pri čemu se obavljaju ispitivanja granične doze korišćenjem sledećeg pristupa: najviše tri obloge se jedna za drugom (uzastopno) nanose na kožu životinje. Prva obloga se uklanja nakon tri minuta i ako se pri tome ne uoči jaka reakcija na koži, nanosi se i druga obloga koja se uklanja nakon jednog sata. Ako uočene promene u ovoj fazi ukazuju da se izlaganje ispitivanoj supstanci može proširiti na četiri sata, nanosi se i treća obloga koja se uklanja nakon četiri sata, a dobijeni nalaz se ocenjuje.

Ako se uoči korozivno oštećenje kože nakon bilo kog od tri uzastopna izlaganja ispitivanoj supstanci, ispitivanje se nakon tog izlaganja prekida. Ako ne dođe do pojave oštećenja na koži nakon što se ukloni i zadnja obloga, životinju je potrebno posmatrati još 14 dana, osim ukoliko ranije dođe do pojave korozivnog oštećenja.

U slučajevima kada se ne očekuje da će ispitivana supstanca dovesti do korozivnog oštećenja kože, ali se pretpostavlja da će izazvati iritaciju, dovoljno je primeniti oblogu na jednu životinju u trajanju od četiri sata.

*1.4.2.4. Ispitivanje kojim se potvrđuje   
(in vivo ispitivanje iritacije kože na dodatnim životinjama)*

Ako se u inicijalnom ispitivanju ne uoči korozivno oštećenje, iritacija ili negativni nalaz kože potrebno je, radi potvrde, sprovesti ispitivanje na još dve dodatne životinje. Na svaku dodatnu životinju primenjuje se jedna obloga tokom perioda izlaganja u trajanju od četiri sata. Ako se u inicijalnom ispitivanju uoči iritacija kože, ispitivanje kojim se potvrđuje izvodi se po fazama ili istovremenim izlaganjem još dve dodatne životinje. U izuzetnom slučaju u kome se inicijalno ispitivanje ne izvodi, dve ili tri životinje mogu se tretirati po jednom oblogom koja se uklanja nakon četiri sata. Ako se koriste dve životinje i kod njih dođe do identičnih nalaza, nije neophodno dalje ispitivanje. U suprotnom, potrebno je i treću životinju uključiti u ispitivanje. Sumnjive (dvosmislene) nalaze ponekad je potrebno potvrditi ispitivanjima na dodatnim životinjama.

*1.4.2.5. Period posmatranja*

Period posmatranja mora da bude dovoljno dug kako bi se u potpunosti odredila reverzibilnost uočenih efekata. Eksperiment se prekida u bilo kom trenutku ako životinja pokazuje neprekidne znakove jakog bola ili patnje. Da bi se odredila reverzibilnost efekata, potrebno je posmatrati životinje nakon uklanjanja obloge i to do 14 dana. Ako se reverzibilnost uoči pre 14 dana, eksperiment se prekida.

*1.4.2.6. Klinička posmatranja i ocenjivanje reakcija na koži*

Kod svih životinje potrebno je ispitati znakove eritema ili edema na koži i oceniti nalaz i to nakon 60 minuta, i kasnije: 24 sata, 48 sati i 72 sata nakon uklanjanja obloge. Kod inicijalnog ispitivanja na jednoj životinji, samo mesto ispitivanja na koži potrebno je pregledati neposredno nakon uklanjanja obloge. Reakcije na koži ocenjuju se i opisuju prema ocenama navedenim u Tabeli. Ako na koži postoji oštećenje koje ne može da se definiše kao iritacija ili korozivno oštećenje nakon 72 sata, posmatranje se produžava do 14 dana kako bi se odredila reverzibilnost efekata. Osim posmatranja iritacije kože, beleže se i opisuju i svi lokalni toksični efekti, poput sušenja kože kao i sistemski štetni efekti (npr. klinički znakovi toksičnosti ili promene u telesnoj masi). U slučaju nejasnih nalaza obavljaju se histopatološka ispitivanja.

Ocenjivanje nalaza kože po svojoj prirodi je subjektivno. Kako bi se podstaklo da ocenjivanje bude usklađeno među različitim laboratorijama, potrebno je osoblje laboratorija adekvatno obučiti za ocenjivanje (videti Tabelu). Dostupan je i ilustrovani vodič za ocenjivanje iritacije kože i drugih lezija**9**.

**2. PODACI**

*2.1. NAVOĐENJE REZULTATA*

Rezultati ispitivanja navode se tabelarno u završnom izveštaju. Rezultati sadrže sve podatke navedene u odeljku 3.1. ove metode.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Ocena iritacije kože sprovodi se u saglasnosti sa prirodom i težinom oštećenja/lezija na koži, kao i sa njihovom reverzibilnošću ili ireverzibilnošću. Pojedinačne ocene same za sebe ne ukazuju na iritativno svojstvo ispitivane hemikalije, budući da se procenjuju i ostali efekti. Pojedinačne ocene se imaju u vidu kao preporuka, i značajne su samo ukoliko su podržane potpunim opisom i procenom svih uočenih efekata.

Kod procene iritativnog odgovora potrebno je razmotriti reverzibilnost oštećenja na koži. Ispitivana supstanca može se smatrati iritativnom kada su nalazi poput alopecije (na ograničenoj površini), hiperkeratoze, hiperplazije ili deskvamacije prisutni sve do kraja perioda posmatranja od 14 dana.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

PISANJE IZVEŠTAJA

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Razlozima za izvođenje *in vivo* ispitivanja:

- analizu kvaliteta postojećih podataka, uključujući rezultate dobijene strategijom ispitivanja korak po korak;

- opis relevantnih podataka dobijenih iz prethodnih ispitivanja;

- podatke iz svakog pojedinačnog koraka strategije ispitivanja;

- opis izvedenih *in vitro* ispitivanja, koji uključuju detalje o postupku i rezultate dobijene za ispitivanu/referentnu supstancu;

- analizu kvaliteta podataka za izvođenje *in vivo* studije.

2) Ispitivanoj supstanci:

- identifikacioni podaci (npr. CAS broj; poreklo, stepen čistoće, poznate nečistoće, broj serije);

- fizičko stanje i fizička i hemijska svojstva (npr. pH, isparljivost, rastvorljivost, stabilnost);

- kod smeše: sastav i relativni procenti sastojaka.

3) Vehikulumu:

- identifikacija, koncentracija (po potrebi), zapremina koja se koristi;

- opravdanost izbora vehikuluma.

4) Eksperimentalnim životinjama:

- vrsta/soj, razlog korišćenja druge vrste, a ne albino kunića;

- broj životinja svakog pola;

- telesna masa pojedinačnih životinja na početku i kraju ispitivanja;

- starost na početku ispitivanja;

- izvor životinja, uslovi smeštaja, ishrana itd.

5) Uslovima ispitivanja:

- način pripreme kože na mestu gde se stavlja obloga;

- detalji o korišćenim materijalima za oblogu, kao i način nanošenja obloge;

- detalji o pripremi ispitivane supstance, primeni i uklanjanju.

6) Rezultatima:

- tabelarni prikaz ocene nalaza iritacije/korozivnog oštećenja kože za svaku životinju pri svakom vremenu posmatranja;

- opisi svih uočenih lezija;

- detaljan opis prirode i stepena iritacije ili korozivnog oštećenja kože, kao i histopatološki nalazi;

- opis svih drugih lokalnih štetnih efekata (npr. obezmašćivanje kože/sušenje) kao i sistemskih efekata.

- tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 - 429.

2. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro,* 2, 19 - 26.

3. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

4. ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 - 524.

5a. Testing Method B.40 Skin Corrosion.

6. OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

7. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

8. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm).

9. EPA (1990) Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990 (Dostupno na zahtev od sekreterijata OECD)

**Deo drugi**

**OCENJIVANJE REAKCIJA NA KOŽI**

Nastanak eritema i eshare

|  |  |
| --- | --- |
| Nema eritema | 0 |
| Veoma slab eritem (jedva vidljiv) | 1 |
| Dobro definisan eritem | 2 |
| Srednje izražen do jak eritem | 3 |
| Jak eritem (crvenilo) uz nastanak eshare |  |
| koja sprečava ocenu eritema | 4 |
| Maksimalna ocena: | 4 |
| Nastanak edema |  |
| Nema edema | 0 |
| Veoma slab edem (jedva vidljiv) | 1 |
| Slab edem (jasno ograničen) | 2 |
| Srednje izražen edem (uzdignut približno 1 mm) | 3 |
| Jak edem (uzdignut iznad 1 mm i proširen |  |
| i na površinu koja nije bila izložena supstanci) | 4 |
| Maksimalna ocena: | 4 |

U slučaju nejasnih nalaza potrebno je obaviti histopatološka ispitivanja.

**Deo treći**

**STRATEGIJA ISPITIVANJA IRITACIJE I KOROZIVNOG OŠTEĆENJA KOŽE KORAK PO KORAK**

**1. OPŠTA RAZMATRANJA**

U interesu naučne zasnovanosti i zbog dobrobiti životinja važno je izbegavati nepotrebno korišćenje životinja ili ispitivanja koja će kod životinja verovatno izazvati jak odgovor. Pre *in vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja potrebno je proceniti sve postojeće podatke koji se odnose na potencijal ispitivane supstance da izazove iritaciju /korozivno oštećenje. Ispitivanje na laboratorijskim životinjama može da se izbegne ako postoji dovoljno podataka i dokaza za klasifikaciju određene supstance u odnosu na potencijal da izazove iritaciju/korozivno oštećenje. Na osnovu analize kvaliteta podataka i strategije ispitivanja korak po korak smanjiće se potreba za *in vivo* ispitivanjima, naročito ako se sumnja na mogućnost da će ispitivana supstanca izazvati intenzivne reakcije na koži.

Analiza kvaliteta podataka koristi se za procenu postojećih podataka o iritaciji/korozivnom oštećenju kože koje izaziva ispitivana supstanca i da bi se utvrdilo da li se osim *in vivo* studija na koži, izvode i dodatna ispitivanja koja bi doprinela da se bolje opiše ovaj potencijal ispitivane supstance. Kada se pokaže potreba za dodatnim ispitivanjima, za prikupljanje novih, relevantnih eksperimentalnih podatka preporučuje se primena strategije ispitivanja korak po korak. Za supstance koje prethodno nisu ispitivane, takođe je potrebno primeniti strategiju ispitivanja korak po korak za određivanje njenih efekata na koži. Strategiju ispitivanja opisanu u ovom Delu razvili su članovi radne grupe OECD**1**, a ista je kasnija potvrđena i proširena u sklopu Globalno harmonizovanog sistema za klasifikaciju i obeležavanje u odnosu na efekte po zdravlje ljudi i na životnu sredinu, na 28-om zajedničkom Simpozijumu hemijske komisije i radne grupe za hemiju, u novembru 1998. godine**2**.

Iako strategija ispitivanja korak po korak nije sastavni deo metode ispitivanja B.4. koja je data u ovom Delu, ona odražava preporučeni pristup za određivanje svojstava supstanci na osnovu iritativnih/korozivnih efekata na koži. Ova metoda ispitivanja predstavlja, sa aspekta etike i prakse, najbolji pristup za *in vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja na koži. Metoda ispitivanja služi kao uputstvo za izvođenje *in vivo* ispitivanja i zbraja faktore koje je potrebno sagledati pre početka ispitivanja na životinjama. Strategija takođe daje preporuku za procenu postojećih podataka o ispitivanoj supstanci, kao i način na koji je potrebno prikupiti nove podatke za supstance za koje su potrebna dodatna ispitivanja ili za supstance za koje nikakva ispitivanja nisu prethodno sprovedena. Pod određenim okolnostima, preporučuje se i izvođenje validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritativnih/korozivnih efekata na koži.

**2. OPIS STRATEGIJE ISPITIVANJA I PROCENE**

Pre početka ispitivanja, kao deo strategije ispitivanja korak po korak (videti Sliku), procenjuju se svi dostupni podaci kako bi se odredila potreba za *in vivo* ispitivanjima na koži. Iako je značajne podatke moguće dobiti procenom jednog parametara (npr. visoki pH), za donošenje konačne odluke o ispitivanjima razmatraju se i svi drugi dostupni podaci, kao što su štetni efekti ispitivane supstance ili njenih analoga. Na kraju je potrebno izneti i objašnjenje za donetu odluku. Akcenat je na postojećim podacima o ispitivanoj supstanci dobijenim iz nalaza kod ljudi i ispitivanja na životinjama, i na ishodu *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja. Gde god je moguće izbegava se *in vivo* studije korozivnih supstanci za koje se unapred zna da su štetne. Faktori koji se uzimaju u obzir u strategiji ispitivanja uključuju:

Procenu postojećih podataka studija dobijenih na osnovu nalaza kod ljudi i podataka iz ispitivanja na životinjama (korak 1). Prvo se razmatraju postojeći podaci na osnovu nalaza kod ljudi npr. kliničke studije, studije nakon profesionalne izloženosti, prikazi slučaja; odnosno iz studija na životinjama npr. podaci iz ispitivanja sa jednom ili ponovljenim dozama, budući da se dobijaju podaci koji su direktno povezani sa efektima na koži. Nije potrebno ispitivati *in vivo* supstance za koje se pouzdano zna da izazivaju iritaciju/korozivno oštećenje kože, kao i one za koje postoje dokazi da nemaju takve efekte.

Analizu odnosa strukture i aktivnosti (u daljem tekstu: SAR) (korak 2). Razmatraju se rezultati ispitivanja strukturno sličnih supstanci, ako takve postoje. Kada dovoljno dostupnih podataka o strukturno sličnim supstancama/smešama tih supstanci ukazuju na njihov potencijal za iritaciju/korozivni efekat, može se pretpostaviti da će ispitivana supstanca u sličnim studijama dati slične nalaze. U takvim slučajevima, supstancu nije potrebno dodatno ispitivati. Negativni rezultati, odnosno podaci koji ukazuju na izostanak ovakvih efekata, iz studije na strukturno sličnim supstancama ili smešama takvih supstanci, ne predstavljaju dovoljno čvrst dokaz o neškodljivosti supstance koja je u postupku analize. Validirani i prihvaćeni SAR pristup koristi se kako bi se identifikovao potencijal za iritativni i korozivni efekat ispitivane supstance.

Fizička i hemijska svojstva i hemijsku reaktivnost (korak 3). Supstance koje imaju ekstremne pH vrednosti kao ≤ 2,0 i ≥ 11,5 mogu imati izražene lokalne efekte. Ako je ekstremni pH osnova za ocenjivanje potencijala supstance da izazove korozivno oštećenje kože, razmatra se i njena kiselo-bazna rezerva (ili puferski kapacitet)**3, 4**. Ako puferski kapacitet ukazuje na to da supstanca ne izaziva korozivno oštećenje kože, neophodno je obaviti dodatna ispitivanja kako bi se potvrdila ova pretpostavka, i to po mogućstvu primenom validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja (videti korake 5 i 6).

Dermalnu toksičnost (korak 4). Ako se pokazalo da je hemikalija veoma toksična nakon dermalne primene, ne preporučuje se *in vivo* ispitivanje iritacije/korozivnog oštećenja, budući da će količina ispitivane supstance koja se uobičajeno primenjuje premašiti onu veoma toksičnu dozu, i dovesti do uginuća ili izrazite patnje životinja. Nisu potrebna dodatna ispitivanja ako prethodno izvedena ispitivanja na albino kunićima primenom doze od 2.000 mg/kg TM ili veće nisu pokazala nikakve štetne efekte na koži. Kod procene akutne dermalne toksičnosti potrebno je imati na umu nekoliko stvari: na primer, beleške o lezijama na koži mogu biti nepotpune. Ispitivanja i opažanja mogu biti obavljena na drugoj vrsti, a ne na kunićima, a druge životinjske vrste mogu bitno da se razlikuju po osetljivosti odgovora. Oblik u kojem je ispitivana supstanca primenjena na kožu možda nije odgovarajući za određivanje iritacije/korozivnog oštećenja kože (npr. razblaživanje supstance kod ispitivanja dermalne toksičnosti**5**). U slučajevima kada su obavljena dobro osmišljena ispitivanja dermalne toksičnosti na koži kunića, negativni nalazi mogu da se smatraju dovoljno čvrstim dokazom da ispitivana supstanca ne izaziva iritaciju/korozivno oštećenje kože.

Rezultate *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja (koraci 5 i 6). Ispitivanje na životinjama nije potrebno vršiti za supstance koje su pokazale korozivno ili jako iritativno svojstvo u *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanjima**6, 7** koja su validirana i prihvaćena upravo za procenu ovih specifičnih efekata, već se može pretpostaviti da će ove supstance dovesti do sličnih efekata i *in vivo*.

*In vivo* ispitivanja na kunićima (koraci 7 i 8). Ako se nakon procene kvaliteta postojećih podataka ipak donese odluka da se izvodi *in vivo* ispitivanje, inicijalno ispitivanje se započinje samo na jednoj životinji. Ako na toj životinji supstanca izazove korozivno oštećenje kože, obustavljaju se dalja ispitivanja. Ako ne dođe do korozivnog oštećenja kože u inicijalnom ispitivanju, potrebno je da se iritativni ili negativni nalaz dodatno potvrdi na još dve eksperimentalne životinje i to za vreme izlaganja u trajanju od četiri sata. Ako se uoči efekat iritacije u inicijalnom ispitivanju, može da se obavi ispitivanje kojim se potvrđuje i to korak po korak, ili istovremenim izlaganjem dve dodatne životinje.

**3. LITERATURA**

1. OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECDWorkshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2. OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

4. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H., (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxicology In vitro, 2(1), p. 19-26.

5. Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and *In vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

6. Testing Method B.40.

7. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

**Deo četvrti**

**ISPITIVANJE I STRATEGIJA PROCENE ZA IRITACIJU/KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Aktivnost** |  | **Nalaz** | **Zaključak** |
| **1** | Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju efekte na koži ili sluzokoži |  | Korozija | Supstanca je korozivna. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  | Iritatacija | Supstanca je iritativna. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  | Nema korozije/iritacije | Suptanca nije iritativna/korozivna. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nema dostupnih podataka, ili su dostupni podaci neadekvatni* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **2** | Izvršiti SAR procenu za iritaciju/korozivno oštećenja koža |  | Predviđa se teško oštećenje kože | Supstanca je korozivna: Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  | Predviđa se iritacija kože | Supstanca je iritativna. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nije moguće predvideti ili su predviđanja negativna i nejasna* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **3** | Odrediti pH (po potrebi, razmotriti puferski kapacitet) |  | pH2 ili  11,5 (sa visokim puferskim kapacitetom, po potrebi) | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *2 pH  11,5, ili pH  2.0 ili  11.5 sa malim / bez puferskog kapaciteta, po potrebi* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **4** | Proceniti podatke koje se odnose na sistemsku toksičnost putem primene na kožu **(1)** |  | Veoma toskično | Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  | Nema korozivnog oštećenja/iritacije pri ispitivanju granične doze od 2000 mg/kg TM ili veće, kod kunića | Smatra se da supstanca nije iritativna/korozivna. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Podaci nisu dostupni ili se smatraju neadekvatnim za izvođenje zaključaka* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **5** | Izvršiti validirana i prihvaćena *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja korozivnog oštećenja kože |  | Korozivno za kožu | Pretpostavlja se korozivno oštećenje *in vivo* ispitivanjima. |
|  |  | Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Supstanca ne dovodi do korozivnog oštećenja* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **6** | Izvršiti validirana i prihvaćena *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritacije kože. |  | Iritativno za kožu | Pretpostavlja se iritacija *in vivo* ispitivanjima. Pretpostavlja se korozivno oštećenje *in vivo* ispitivanjima |
|  |  |  |  |  |
|  | Validirane *in vitro* ili *ex vivo* metode ispitivanja iritacije kože još nisu razvijene ili supstanca nema iritativni efekat |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **7** | Izvršiti inicijalno *in vivo* ispitivanje na jednom kuniću |  | Teško oštećenje kože | Supstanca je korozivna. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nema teških oštećenja* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **8** | Obaviti na jednoj ili dve dodatne životinje ispitivanje kojim se potvrđuje |  | Korozivno ili iritativno | Supstanca je korozivna ili iritativna. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  | Nije korozivno ili iritantno | Supstanca nije korozivna ili iritativna. |
|  |  | Dalja ispitivanja nisu potrebna |
| \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ **(1)** može se razmotriti pre koraka 2 i 3. | | | | |

**B.5. AKUTNA TOKSIČNOST:   
IRITACIJA/TEŠKO OŠTEĆENJE OKA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 405 (2002).

*1.1. UVOD*

U pripremi ažurirane verzije ove metode ispitivanja posebna pažnja posvećena je mogućim poboljšanjima u odnosu na dobrobit životinja, kao i na procenu svih postojećih podataka o ispitivanoj supstanci, sa ciljem da se izbegnu nepotrebna ispitivanja na životinjama. Metoda ispitivanja zasniva se na preporuci da se pre *in vivo* ispitivanja akutnog iritativnog/korozivnog oštećenje oka obavi analiza kvaliteta postojećih podataka**1**. Kada nema dovoljno podataka, moguće je dobiti ih primenom ispitivanja korak po korak**2, 3**. Strategija ispitivanja uključuje i obavljanje validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja koja su opisana u Delu trećem ove metode. Pre izvođenja *in vivo* ispitivanja oka preporučuje se korišćenje *in vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože koja mogu da predvide iritaciju oka.

U interesu naučne zasnovanosti i dobrobiti životinja jeste da se *in vivo* studije započinju nakon procene svih dostupnih podataka koji su relevantni za procenu potencijala supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka. Takvi podaci proizlaze iz prethodno dobijenih nalaza kod ljudi odnosno sprovedenih ispitivanja na laboratorijskim životinjama, iz dokaza o iritaciji /korozivnom oštećenju jedne ili više strukturno sličnih supstanci ili smeša takvih supstanci, ali i iz podataka koji ukazuju na jaku kiselost ili baznost ispitivane supstance**4, 5,** ili iz prethodno već validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože**6, 6a**. Studije mogu da budu sprovedene ranije ili da nastanu kao rezultat analize kvaliteta postojećih podataka.

Za neke supstance analiza može da ukaže na potrebu za *in vivo* ispitivanjima potencijala supstance za iritaciju/teškog oštećenja oka. U svim takvim slučajevima, pre *in vivo* ispitivanja efekata na oku, preporučuje se *in vivo* ispitivanje efekata na koži u skladu sa metodom ispitivanja B.4. koja je data u ovom Delu**7**. Primena analize kvaliteta postojećih podataka i studije ispitivanja korak po korak smanjuje potrebu za *in vivo* ispitivanjima iritacije/teškog oštećenja oka za supstance za koje postoje dovoljno podataka iz drugih studija. Ako potencijal supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka ne može da se odredi korišćenjem metode ispitivanja korak po korak čak ni nakon ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože, pristupa se *in vivo* ispitivanju iritacije/teškog oštećenja oka.

U Delu trećem ove metode opisana je strategija ispitivanja korak po korak koja uključuje i obavljanje validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja. Strategiju su razvili, kao jedinstveno prihvaćenu i preporučenu, članovi radne grupe OECD**8**, a ista je prihvaćena i uvrštena u preporučene strategije ispitivanja od strane Globalno harmonizovanog sistema za klasifikaciju i obeležavanje (u daljem tekstu: GHS)**9**. Ova strategija se preporučuje pre bilo kakvih *in vivo* ispitivanja. Za nove supstance, ispitivanje korak po korak je preporučeni pristup za dobijanje naučno zasnovanih podataka o njihovim iritativnim/korozivnim efektima. Za supstance koje su već obuhvaćene ispitivanjima, ista strategija se primenjuje za upotpunjavanje podataka o iritativnim/korozivnim efektima na oko i kožu. Primenu drugačije strategije ispitivanja ili postupka, ili odluku da se ne primeni ova usvojeno ispitivanje korak po korak, potrebno je objasniti i obrazložiti.

*1.2. DEFINICIJE*

Iritacija oka jeste nastanak promena u oku do kojih dolazi nakon primene ispitivane supstance na spoljašnju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u periodu od 21 dana nakon primene.

Teško oštećenje oka jeste oštećenje tkiva oka ili ozbiljno pogoršanje vida nakon primene ispitivane supstance na spoljašnju površinu oka, koje nije potpuno reverzibilno u periodu od 21 dana nakon primene.

*1.3. PRINCIP METODE*

Supstanca koja se ispituje primenjuje se u jednoj dozi u jedno oko eksperimentalne životinje. Netretirano oko služi kao kontrola. Stepen iritacije/teškog oštećenja oka procenjuje se ocenjivanjem lezija konjuktive, rožnjače i dužice, u prethodno određenim vremenskim intervalima. Da bi se obezbedila kompletna procena efekata opisuju se i druge promene na oku i sistemski štetni efekti. Ispitivanje traje dovoljno dugo da se proceni reverzibilnost ili ireverzivbilnost efekata.

Životinje koje u bilo kom delu ispitivanja pokazuju stalne znakove patnje odnosno bola lišavaju se života na human način, a supstanca se procenjuje u skladu sa tim. Kriterijumi za donošenje odluke o lišavanju života na human način životinja koje su na samrti i pokazuju znake izrazite patnje, opisani su u literaturi**10**.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Priprema za *in vivo* ispitivanje**

*1.4.1.1. Izbor životinja*

Preporučuje se korišćenje zdravih mladih jedinki albino kunića. Ukoliko se koristi druga životinjska vrsta, navode se razlozi za to korišćenje.

*1.4.1.2. Priprema životinja*

Kod svake eksperimentalne životinje koja je prethodno odabrana za ispitivanje pregledaju se oba oka 24 sata pre početka ispitivanja. Životinje kod kojih je uočena iritacija oka, nedostatak ili već postojeća povreda rožnjače ne koriste se za ispitivanje.

*1.4.1.3. Uslovi smeštaja i ishrana*

Životinje se smeštaju u odgovarajući smeštaj za pojedinačno i odvojeno držanje. Temperatura smeštajnog prostora u kome se drže kunići održava se na 20° C (± 3° C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30% i da ne prelazi 70% (osim u slučajevima kada se prostorija sa životinjama čisti). Idealna vlažnost je između 50% i 60%. Osvetljenje je veštačko i to u intervalima od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Životinje se hrane uobičajenom hranom za laboratorijske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće.

**1.4.2. Postupak ispitivanja**

*1.4.2.1. Primena ispitivane supstance*

Ispitivana supstanca primenjuje se u konjuktivalnu kesu jednog oka svake životinje nakon što se lagano povuče donji kapak očne jabučice. Kapci se zatim nežno spoje na otprilike jednu sekundu da bi se sprečio gubitak supstance. Drugo oko, koje nije tretirano supstancom, služi za kontrolu.

*1.4.2.2. Ispiranje*

Oči životinja najmanje 24 sata od primene ne smeju da se ispiraju, osim ako se primenjuje čvrsta supstanca (videti odeljak 1.4.2.3.2. ove metode) i u slučaju neposrednog korozivnog ili iritativnog efekta. Nakon 24 sata od primene, ukoliko se proceni da je potrebno, oko može da se ispere.

Ne preporučuje se korišćenje propratne grupe životinja za istraživanje uticaja koji se javljaju nakon ispiranja, osim ukoliko je naučno opravdano. Ako je potrebno koristiti propratnu grupu životinja, uzimaju se dva kunića. Uslovi ispiranja pažljivo se dokumentuju, npr. vreme ispiranja, sastav i temperatura tečnosti za ispiranje; trajanje, intenzitet i brzina primene.

*1.4.2.3. Dozni nivoi*

1.4.2.3.1. Ispitivanje tečnosti

Za ispitivanje tečnosti koristi se doza ispitivane supstance u zapremini od 0,1 mL. Za ukapavanje supstance direktno u oko ne smeju se koristiti sprejevi sa pumpicom. Tečni sprej se istiskuje i sakuplja u bočice pre ukapavanja 0,1 mL u oko.

1.4.2.3.2. Ispitivanje čvrstih supstanci

Kada se ispituje čvrsta supstanca, pasta, supstance u obliku čestica zapremina koja se koristi je 0,1 mL ili je to masa koja nije veća od 100 mg. Ispitivana supstanca se usitnjava u fini prah. Količina čvrste supstance meri se nakon što je pažljivo sabijena i stavljena u posudu za merenje. Ako se kod prvog posmatranja koje je se obavlja jedan sat nakon nanošenja čvrste ispitivane supstance uoči da ona nije odstranjena iz oka životinje pomoću fizioloških mehanizama, oko može se ispere fiziološkim rastvorom ili destilovanom vodom.

1.4.2.3.3. Ispitivanje aerosola

Preporučuje se prikupljanje svih sprejeva sa pumpicom i aerosola pre nanošenja (ukapavanja) u oko. Izuzetak su supstance u aerosol bočicama pod pritiskom, koje se zbog isparavanja ne prikupljaju unapred. U tim slučajevima oko se drži otvoreno i ispitivana supstanca se nanosi u jednom potezu direktno u oko u trajanju oko jedne sekunde, sa udaljenosti od 10 cm. Ova udaljenost može da varira, u zavisnosti od pritiska spreja i njegovog sastava. Vodi se računa da pritisak u spreju ne ošteti oko. U nekim slučajevima, postoji potreba za procenom mogućnosti za "mehaničko" oštećenje oka koje su izazvale sile spreja.

Procena doze ispitivane supstance spreja može se utvrditi simuliranjem ispitivanja na sledeći način: supstanca se naprska po papiru za merenje kroz otvor veličine oka kunića. Povećanje mase papira približno je dozi koja je naprskana u oko. Kod isparljivih supstanci, doza se može utvrditi merenjem bočice pre i posle prskanja ispitivane supstance.

*1.4.2.4. Inicijalno ispitivanje   
(In vivo ispitivanje iritacije/teškog oštećenja oka na jednoj životinji)*

Preporučuje se *in vivo* ispitivanje na jednoj životinji kao što je opisano u strategiji ispitivanja korak po korak (videti Deo treći ove metode).

Ako rezultati pokažu da supstanca izaziva teško oštećenje ili jaku iritaciju oka pri korišćenju propisane metode, ne sprovode se dalja ispitivanja na oku.

*1.4.2.5. Lokalni anestetici*

Lokalni anestetici mogu da se koriste zavisno od slučaja. Ako analize kvaliteta postojećih podataka ukazuju da supstanca može da izazove bol ili inicijalno ispitivanje pokaže prisustvo bolnih reakcija, pre nanošenja ispitivane supstance može da se upotrebi lokalni anestetik. Vrsta, koncentracija i doza lokalnog anestetika bira se pažljivo, da se spreče odstupanja u reakciji na ispitivanu supstancu zbog njegovog korišćenja. Kontrolno oko je takođe pod lokalnom anestezijom.

*1.4.2.6. Ispitivanje kojim se potvrđuje   
(In vivo ispitivanje iritacije oka na dodatnim životinjama)*

Ako u inicijalnom ispitivanju nije uočeno teško oštećenje oka, iritacija ili negativan rezultat, ono se potvrđuje korišćenjem najviše dve dodatne životinje. Ukoliko se u inicijalnom ispitivanju uoči značajna iritacija koja ukazuje da može da se ponovi jak (ireverzibilan) efekat i u ispitivanju kojim se potvrđuje, preporučeno je da se ispitivanje kojim se potvrđuje izvodi postepeno, prvo na jednoj pa na drugoj životinji, pre nego da se ispitivanje izvodi na obe životinje istovremeno. Ako druga životinja pokaže znakove iritacije ili teškog oštećenja oka, ispitivanje se ne nastavlja. Dodatne životinje mogu da budu potrebne kada se utvrđuju znakovi slabe ili srednje teške iritacije.

*1.4.2.7. Period posmatranja*

Posmatranje traje dovoljno dugo da bi se u potpunosti utvrdio značaj i reverzibilnost uočenih efekata. Eksperiment se obustavlja uvek kada životinja pokazuje neprekidne znakove bola ili patnje**9**. Da bi se utvrdila reverzibilnost efekata, životinje se posmatraju 21 dan nakon primene supstance. Ako se pre isteka 21-og dana uoči da su efekti reverzibilni, eksperiment se prekida.

1.4.2.7.1. Klinička posmatranja i ocenjivanje reakcija na oku

Pregled očiju obavlja se nakon 1 sata, 24 sata, 48 sati i 72 sata od primene supstance. Životinje se ne drže u ispitivanju nakon što se dobiju definitivni podaci. Životinje koje pokazuju neprekidne znakove jakog bola ili patnje lišavaju se života na human način bez odlaganja, a supstanca se procenjuje u skladu sa tim. Životinje koje se nakon primene ispitivane supstance lišavaju života na human način mogu imati sledeća oštećenja oka: perforirana rožnjača ili jaka ulceracija rožnjače koja obuhvata stafilom, krv u prednjoj komori oka, četvrti stepen zamućenja rožnjače koji traje 48 sati, nedostatak refleksa na svetlost (ocena 2 reakcije irisa koji traje 72 sat, ulceracija membrane konjuktive, nekroza konjuktive ili membrane sa trepavicama ili deskvamacija. Razlog za lišavanje života na human način jeste što su ove lezije (oštećenja) uglavnom trajne.

Životinje kod kojih se lezije oka ne razviju, mogu da se tretiraju tek nakon trećeg dana od primene. Životinje sa slabim do srednje teškim oštećenjima posmatraju se do uočavanja jasne lezije ili tokom 21 dan, nakon čega se ispitivanje prekida. Posmatranja se obavljaju 7 dana, 14 dana i 21 dan da bi se utvrdio obim oštećenja i njihova reverzibilnost ili ireverzibilnost.

Ocenjivanje reakcije na oku (konjuktiva, rožnjača i dužica) se beleži kod svakog ispitivanja (videti Deo drugi ove metode). Navode se sva druga oštećenja oka (panus, prebojenost) i druge promene.

Ispitivanje reakcija vrši se uz korišćenje binokularne lupe, ručne slit-lampe, biomikroskopa ili drugog odgovarajućeg pribora. Nakon beleženja rezultata posmatranja nakon 24 sata, oči dodatno mogu da budu pregledane flourescentnom lampom.

Ocenjivanje nalaza na oku po svojoj prirodi je subjektivno. Kako bi se podstaklo da ocenjivanje nalaza oka bude usklađeno među različitim laboratorijama, potrebno je da se osoblje laboratorija adekvatno obuči za ocenjivanje i tumačenje rezultata.

**2. PODACI**

*2.1. PROCENA REZULTATA*

Ocena iritacije oka procenjuje se u skladu sa prirodom i težinom lezija i njihovom reverzibilnošću ili ireverzibilnošću. Pojedinačne ocene same za sebe ne ukazuju na iritativna svojstva hemikalije, budući da se procenjuju i ostali efekti. Pojedinačne ocene se imaju u vidu kao preporuka i značajne su samo ukoliko su podržane potpunim opisom i procenom svih uočenih efekata.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

*3.1. PISANJE IZVEŠTAJA*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Razlozima za *in vivo* ispitivanje:

- analiza procene kvaliteta postojećih podataka, uključujući i rezultate strategije ispitivanja korak po korak

- opis relevantnih podataka dobijenih iz prethodnih ispitivanja;

- podaci dobijeni iz svakog koraka strategije ispitivanja;

- opis *in vitro* izvedenih ispitivanja uključujući detalje o postupku i rezultate dobijene za ispitivanu/referentnu supstancu;

- opis *in vivo* izvedene studije iritacije/teškog oštećenja oka, uključujući dobijene rezultate;

- analiza kvaliteta podataka za izvođenje *in vivo* studije.

2) Ispitivanoj supstanci:

- identifikacioni podaci (npr. CAS broj, poreklo, čistoća, poznate nečistoće, broj serije);

- fizičko stanje i fizička i hemijska svojstva (npr. pH, isparljivost, rastvorljivost, stabilnost, hemijska reakcija sa vodom);

- kod smeša: sastav i relativni procenti sastojaka;

- ako se koristi lokalni anestetik: identifikacija, čistoća, tip, doza, eventualna interakcija sa supstancom.

3) Vehikulumu:

- identifikacija, koncentracija (po potrebi), zapremina koja se koristi;

- opravdanost za izbor vehikuluma.

4) Eksperimentalnim životinjama:

- vrsta/soj, razlog za korišćenje druge vrste a ne albino kunića;

- starost svake životinje na početku studije;

- broj životinja oba pola u ispitivanju i kontrolnim grupama (po potrebi);

- telesna masa pojedinačnih životinja na početku i kraju ispitivanja;

- izvor životinja, uslovi smeštaja, ishrana itd.

5) Rezultatima:

- opis metode koja je korišćena za ocenjivanje reakcije pri svakom vremenu posmatranja (npr. ručna slit-lampa, biomikroskop, fluorescentno svetlo);

- tabelarni prikaz nalaza iritacije/teškog oštećenja za svaku životinju pri svakom vremenu posmatranja do uklanjanja životinje iz ispitivanja;

- opis stepena i prirode uočene iritacije ili teškog oštećenja;

- opis drugih uočenih lezija na oku (npr. vaskularizacija, formiranje panusa, prebojenost, adhezija);

- opis svih lokalnih efekata koji nisu na oku i sistematskih štetnih efekata, i histopatološki nalazi ukoliko ih ima;

- tumačenje rezultata.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Rezultati studije iritacije oka na laboratorijskim životinjama mogu se ekstrapolirati na ljude, i validni su u ograničenom stepenu. U mnogim slučajevima albino kunić pokazuje veću osetljivost na iritanse ili korozive oka od čoveka.

Precizno se tumače rezultati da bi se isključila iritacija koja je rezultat sekundarne infekcije.

**4. LITERATURA**

1. Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410-429.

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

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

4. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicollogy In vitro, 2, p. 19-26.

5. Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, p. 227-231.

6. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

6a. Testing Method B.40 Skin Corrosion.

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

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

9. OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

10. OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

**Deo drugi**

**OCENJIVANJE OŠTEĆENJA OKA**

|  |  |
| --- | --- |
| Rožnjača |  |
| Zamućenost: stepen zamućenosti (očitava se nalaz sa mesta najveće gustine)\* |  |
| Nema ulceracija ni zamućenja | 0 |
| Rasute ili difuzne površine zamućenja |  |
| (osim neznatnog gubitka normalnog sjaja); |  |
| dužica jasno vidljiva | 1 |
| Lako raspoznatljiva providna površina; |  |
| dužica blago zamućena | 2 |
| Nekrotična površina; detalji dužice nisu vidljivi; |  |
| veličina zenica se jedva raspoznaje | 3 |
| Zamućenje rožnjače; dužica se ne raspoznaje |  |
| kroz zamućenje | 4 |
| Mogući maksimum: | 4 |
| \* Beleži se veličina površine zamućenja rožnjače. |  |
| Dužica |  |
| Normalna | 0 |
| Izrazito duboka bora, kongestija, oticanje, |  |
| umerena hiperemija oko rožnjače; ili nadraženost; |  |
| dužica reaguje na svetlost (spora reakcija se smatra |  |
| efektom) | 1 |
| Krvarenje, obimna destrukcija, izostanak reakcije |  |
| na svetlost | 2 |
| Mogući maksimum: | 2 |
| Konjuktiva |  |
| Crvenilo (odnosi se na palpebralni i bulbarni deo konjuktive; izuzev rožnjače i dužice) |  |
| Normalna | 0 |
| Hiperemija nekih kapilara | 1 |
| Difuzno crvenilo (tamno crvena) |  |
| pojedinačni kapilari nisu jasno vidljivi | 2 |
| Difuzno crvenilo boje mesa | 3 |
| Mogući maksimum: | 3 |
| Hemoza |  |
| Oticanje (odnosi se na kapke odnosno treći kapak) |  |
| Normalno | 0 |
| Oticanje iznad normale | 1 |
| Jasno oticanje, sa parcijalnim uvrtanjem kapaka | 2 |
| Oticanje, sa kapcima zatvorenim na pola | 3 |
| Oticanje, sa kapcima zatvorenim više od pola | 4 |
| Mogući maksimum: | 4 |

**Deo treći**

**STRATEGIJA ISPITIVANJA IRITACIJE I TEŠKOG OŠTEĆENJA OKA KORAK PO KORAK**

**1. OPŠTA RAZMATRANJA**

U interesu naučne zasnovanosti i zbog dobrobiti životinja, važno je izbegavati nepotrebno korišćenje životinja ili ispitivanja koja će kod životinja verovatno izazvati jak odgovor. Pre *in vivo* ispitivanja iritatacije/teškog oštećenja oka, potrebno je proceniti sve postojeće podatke koji se odnose na potencijal ispitivane supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka. Ako postoji dovoljno podataka i dokaza za klasifikaciju određene supstance u odnosu na potencijal da izazove iritaciju/teško oštećenje oka, može da se izbegne ispitivanje na laboratorijskim životinjama. Na osnovu analize kvaliteta podataka i strategije ispitivanja korak po korak smanjiće se potreba za *in vivo* ispitivanjima, naročito ako se sumnja na mogućnost da će ispitivana supstanca izazvati intenzivne reakcije.

Analiza kvaliteta postojećih podatka koristi se za procenu postojećih podataka o iritaciji/teškom oštećenju oka koje izaziva ispitivana supstanca kako bi se utvrdilo da li je osim *in vivo* ispitivanja na koži neophodno obaviti i dodatna ispitivanja koja doprinose da se bolje opiše ovaj potencijal ispitivane supstance. Kada se pokaže potreba za dodatnim ispitivanjima, za prikupljanje novih relevantnih eksperimentalnih podatka preporučuje se primena strategije ispitivanja korak po korak. Za supstance koje prethodno nisu ispitivane, takođe je potrebno primeniti strategiju ispitivanja korak po korak za određivanje njenih efekata na oku. Strategiju ispitivanja opisanu u ovom delu razvili su članovi radne grupe OECD**1**, a ista je kasnije potvrđena i proširena u sklopu Globalno harmonizovanog sistema za klasifikaciju hemijskih supstanci u odnosu na efekte po zdravlje ljudi i na životnu sredinu, na 28-om zajedničkom Simpozijumu hemijske komisije i radne grupe za hemiju, u novembru 1998. godine**2**.

Iako ova strategija ispitivanja korak po korak nije sastavni deo metode ispitivanja B.5. koja je data u ovom prilogu, ona odražava preporučeni pristup za određivanje svojstava supstanci na osnovu iritativnih/korozivnih efekata na oku. Sa aspekta etike i prakse metoda ispitivanja predstavlja najbolji pristup za *in vivo* ispitivanja iritacije/teškog oštećenja na oku. Metoda ispitivanja služi i kao uputstvo za izvođenje *in vivo* ispitivanja i zbraja faktore koje je potrebno sagledati pre početka ispitivanja na životinjama. Strategija takođe daje preporuku za procenu postojećih podataka o ispitivanoj supstanci kao i način na koji je potrebno prikupiti nove podatke za supstance za koje su potrebna dodatna ispitivanja ili za supstance za koje nisu prethodno sprovedena nikakva ispitivanja. Strategija kao prvo uključuje izvođenje validiranog i prihvaćenog *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja, a zatim metodu ispitivanja B.4. koja je data u ovom prilogu iritativnih/korozivnih efekata na koži pod specifičnim uslovima**3, 4**.

**2. OPIS STRATEGIJE ISPITIVANJA KORAK PO KORAK**

Pre početka ispitivanja u sklopu metode ispitivanja korak po korak (videti Sliku), potrebno je proceniti postojeće podatke kako bi se odredila potreba za *in vivo* ispitivanjima na oku. Iako je značajne podatke moguće dobiti procenom jednog parametara (npr. visoki pH), za donošenje konačne odluke o ispitivanjima razmatraju se i svi drugi dostupni podaci, kao što su štetni efekti ispitivane supstance ili njenih analoga. Na kraju je potrebno izneti i objašnjenje za donetu odluku. Akcenat je na postojećim podacima o ispitivanoj supstanci dobijenim iz podataka na osnovu nalaza kod ljudi i ispitivanja na životinjama, i na ishodu *in vitro* ili ex vivo ispitivanja. *In vivo* studije korozivnih supstanci za koje se unapred zna da su štetne i izbegavaju se gde god je to moguće. Faktori koji se uzimaju u obzir u strategiji ispitivanja uključuju:

Procenu postojećih podataka dobijenih na osnovu nalaza kod ljudi i na ispitivanja kod životinja. (korak 1). Prvo se razmatraju postojeći podaci na osnovu nalaza kod ljudi, npr. kliničke studije, studije nakon profesionalne izloženosti, prikazi slučaja, odnosno podaci iz studija na oku životinja, budući da se dobijaju podaci koji su direktno vezani za efekte na oko. Procenjuju se dostupni podaci iz studija u kojima su vršena istraživanja iritacije/korozivnog oštećenja na osnovu nalaza kod ljudi odnosno ispitivanja kod životinja. Supstance za koje je poznato da izazivaju jaku iritaciju/ korozivno oštećenje oka ne smeju se unositi u oko životinja, kao ni supstance sa istim efektom na koži, jer je to siguran pokazatelj da su iritativni/korozivni i za oko. Supstance za koje ima dovoljno dokaza da ne izazivaju iritaciju/teško oštećenje oka u prethodno izvedenim ispitivanjima, ne ispituju se u *in vivo* studijama oka.

Analizu odnosa strukture i aktivnosti (u daljem tekstu: SAR) (korak 2). Razmatraju se rezultati ispitivanja strukturno sličnih supstanci, ako su dostupni. Kada dovoljno dostupnih podataka o strukturno sličnim supstancama/smešama tih supstanci ukazuju na njihov potencijal za iritaciju/korozivni efekat na oku, može se pretpostaviti da će ispitivana supstanaca dati slične nalaze. U takvim slučajevima supstancu nije potrebno dodatno ispitivati. Negativni rezultati, odnosno podaci koji ukazuju na izostanak ovakvih efekata iz studije na strukturno sličnim supstancama ili smešama takvih supstanci, ne predstavljaju dovoljno čvrst dokaz o neškodljivosti supstance koja je u postupku ispitivanja. Validirani i prihvaćeni SAR pristup koristi se za identifikaciju potencijala za iritativni i korozivni efekat ispitivane supstance na oku i koži.

Fizička i hemijska svojstva i hemijsku reaktivnost (korak 3). Supstance koje imaju ekstremne pH vrednosti kao ≤ 2,0 ili ≥ 11,5 mogu imati izražene lokalne efekte. Ako je ekstremni pH osnova za ocenjivanje potencijala supstance da izazove teško oštećenje oka, razmatra se i njena kiselo-bazna rezerva (ili puferski kapacitet)**5, 6**. Ako puferski kapacitet ukazuje na to da supstanca ne izaziva teško oštećenje oka, neophodno je obaviti dodatna ispitivanja kako bi se potvrdila ova pretpostavka, i to ako je moguće primenom validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja (videti korake 5 i 6).

Razmatranje ostalih postojećih podataka (korak 4). U ovom koraku procenjuju se svi dostupni podaci o sistemskoj toksičnosti kod dermalnog puta primene. Akutna dermalna toksičnost ispitivane supstance takođe se razmatra. Ako se pokaže da je ispitivana supstanca veoma toksična ako se primeni na kožu, ne postoji potreba za ispitivanjem na oku, jer ako je veoma toksična nakon dermalnog puta primene, može se pretpostaviti da će izazvati jaku reakciju ako se nanese u oko. Taj podatak takođe može da bude razmotren u koraku 2 i 3.

Rezultate *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja (korak 5 i 6). Ispitivanje na životinjama nije potrebno vršiti za supstance koje su pokazale korozivno ili jako iritativno svojstvo u *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanjima**7, 8** koja su validirana i prihvaćena upravo za procenu iritacije/teškog oštećenja oka ili kože. Može se pretpostaviti da takve supstance pokazuju slične efekte *in vivo*. Ako ne postoje validirana i prihvaćena *in vitro/ex vivo* ispitivanja, korak 5 i 6 se preskaču i direktno se pristupa koraku 7.

*In vivo* procenu iritacije ili korozivnog oštećenja kože (korak 7). Kada nema dovoljno dokaza za izvođenje zaključne analize kvaliteta podataka o potencijalu supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka na osnovu pomenutih studija, prvo se procenjuje *in vivo* potencijal iritacije/korozivnog oštećenja kože korišćenjem metode ispitivanja B.4. koja je data u ovom Prilogu**4** i Delu trećem datom uz tu metodu ispitivanja**9**. Ako se pokaže da supstanca izaziva korozivno oštećenje ili tešku iritaciju kože, a ne postoje drugi podaci koji dokazuju suprotno, pretpostavlja se da je supstanca korozivna/iritativna i za oko. U tom slučaju nema potrebe za izvođenjem *in vivo* ispitivanja na oku. Ako supstanca nije korozivna/iritativna za kožu, izvodi se *in vivo* ispitivanje na oku.

*In vivo* ispitivanje na kunićima (korak 8 i 9). *In vivo* ispitivanje na oku započinje inicijalnim ispitivanjem korišćenjem jedne životinje. Nije potrebno izvoditi dalje ispitivanje ako rezultati ispitivanja ukažu da je supstanca jak iritans ili koroziv za oko. Ako ispitivanje ne pokaže nikakve značajne reakcije, potrebno je, sa dve dodatne životinje, izvesti ispitivanje kojim se potvrđuje (confoirmatory test).

**3. LITERATURA**

1. OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2. OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

4. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H., (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxicology In vitro, 2(1), p. 19-26.

5. Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and *In vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

6. Testing Method B.40.

7. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

**Deo četvrti**

**ISPITIVANJE I STRATEGIJA PROCENE ZA IRITACIJU/TEŠKO OŠTEĆENJE OKA**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Aktivnost** |  | **Nalaz** | **Zaključak** |
| **1** | Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju efekte na očima |  | Teško oštećenje oka | Supstanca je korozivna za oko Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  | Iritacija oka | Supstanca je iritativna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  | Nema teškog oštećenja/iritacije oka | Supstanca nije iritativna/korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
| Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju korozivne efekte na koži |  | Korozivno oštećenje kože | Pretpostavlja se da je korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
| Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju jake iritativne efekte na koži |  | Jaka iritacija kože | Pretpostavlja se da je iritativna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nema dostupnih podataka, ili su dostupni podaci neadekvatni* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **2** | Izvršiti SAR procenu za iritaciju/teško oštećenje oka |  | Predviđa se teško oštećenje oka | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  | Predviđa se iritacija oka | Pretpostavlja se da je supstanca iritativna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
| Izvršiti SAR procenu za korozivno oštećenje kože |  | Predviđa se korozivno oštećenje kože | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nije moguće predvideti, ili su predviđanja negativna i nejasna* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **3** | Odrediti pH (po potrebi, razmotriti puferski) |  | pH  2 ili  11,5 (sa visokim puferskim kapacitetom, po potrebi) | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *2  pH  11,5 pH  2.0 ili  11.5 sa malim / bez puferskog kapaciteta, po potrebi* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **4** | Procenti podataka koje se odnose na sistemsku toksičnost putem primene na kožu |  | Veoma toksično pri konsentracijama u kojima se ispituje na oku | Supstanca bi bila previše toksična za ispitivanje. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *Takvi podaci nisu dostupni ili supstanca nije veoma toksična* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **5** | Izvršiti validirana i prihvaćena *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja teškog oštećenja oka |  | Korozivna reakcija | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Validirane in vitro ili ex vivo metode ispitivanja teškog oštećenja oka još nisu razvijene ili supstanca nema korozivni efekat* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **6** | Izvršiti validirana i prihvaćena *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja iritacije oka |  | Iritativna reakcija | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Validirane in vitro ili ex vivo metode ispitivanja iritacije oka još nisu razvijene ili supstanca nema iritativni efekat* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **7** | Eksperimentalno proceni potencijal *in vitro* iritacije/korozivnog oštećenja kože vidi metodu ispitivanja B.4 uključujući Deo treći |  | Korozivna ili jaka iritativna reakcija | Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna. |
|  |  |  |  |  |
|  | *Supstanca ne dovodi do korozivnog oštećenja ili jake iritacije kože* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **8** | Izvršiti inicijalno *in vivo* ispitivanje oka na jednom kuniću |  | Teško oštećenje oka | Supstanca je korozivna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  |  |  |  |  |
|  | *Nema teških oštećenja ili nema reakcije* |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| **9** | Obaviti na jednoj ili dve dodatne životinje ispitivanje kojim se potvrđuje |  | Korozivno ili iritativno | Supstanca je korozivna ili iritativna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |
|  | Nije korozivno ili iritativno | Supstanca nije korozivna ili iritativna za oko. Dalja ispitivanja nisu potrebna |

**B.6. SENZIBILIZACIJA KOŽE**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Napomene: Osetljivost i mogućnost ispitivanja kojim se određuje potencijal supstanci koje izazivaju senzibilizaciju kože kod ljudi, smatraju se važnim u sistemu klasifikacije na osnovu toksičnosti i važni su za javno zdravlje.

Ne postoji metoda ispitivanja koja na odgovarajući način identifikuje sve supstance koje izazivaju preosetljivost kože ljudi i koja je relevantna za sve supstance.

Činioci kao što su fizička svojstva supstance, uključujući njihovu sposobnost prodiranja u kožu, uzimaju se u obzir pri izboru odgovarajuće metode ispitivanja.

Razvijene su dve vrste metoda ispitivanja u kojima se koriste zamorci: metode ispitivanja sa adjuvansom u kojima se alergijska reakcija izaziva rastvaranjem ili suspendovanjem ispitivane supstance "Frojndovom kompletnom adjuvansu" (u daljem tekstu: FCA), i metode ispitivanja bez adjuvansa.

Metode ispitivanja sa adjuvansom su verovatno tačnije u predviđanju da supstanca kod ljudi izaziva senzibilizaciju kože, za razliku od metoda ispitivanja koje ne koriste FCA. Zbog ovoga se preporučuju metode ispitivanja sa adjuvansom.

Test maksimizacije na zamorcima (The Guinea-Pig Maximisation Test, u daljem tekstu: GMPT) je opšte prihvaćen test sa adjuvansom. Za otkrivanje potencijala izazivanja preosetljivosti neke supstance može se koristiti nekoliko različitih metoda ispitivanja, ali se preporučuje GMPT metoda ispitivanja sa adjuvansom.

U slučaju većine klasa hemikalija, eksperimentalne metode ispitivanja bez adjuvansa (prednost se daje Buehler testu) smatraju se manje osetljivim.

U određenim slučajevima postoji opravdan razlog za primenu Buehler testa u kome se ispitivana supstanca primenjuje topikalno, a ne u obliku intradermalne injekcije, kao što je slučaj u GMPT. Za korišćenje Buehler testa, potrebno je dati i naučno zasnovano obrazloženje.

GMPT i Buehler test dati su u ovoj metodi ispitivanja. Ostale metode ispitivanja koriste se ako su prethodno potvrđene i ako je njihovo korišćenje naučno opravdano.

Ako se u skrining testu dobije pozitivan rezultat, ispitivana supstanca se označava kao potencijalni uzročnik senzibilizacije. U tom slučaju ne nastavljaju se dalja ispitivanja na zamorcima. Ako se u skrining testu dobije negativan rezultat, ispitivanje na zamorcima se sprovodi koristeći postupke date u ovoj metodi.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Senzibilizacija kože (Alergijski kontaktni dermatitis) jeste imunološki posredovana, kožna reakcija na određenu supstancu. Kod ljudi odgovor može biti okarakterisan svrabom, crvenilom, otokom, papulama (bubuljicama), vezikulama (mehurićima), bulama (plikovima) ili njihovom kombinacijom. Kod drugih vrsta reakcije se mogu razlikovati, i mogu se javiti samo eritem ili edem.

Indukcija jeste eksperimentalno izlaganje jedinke ispitivanoj supstanci sa namerom izazivanja reakcije preosetljivosti.

Faza indukcije jeste vremenski period u trajanju od najmanje nedelju dana nakon indukcije tokom kojeg dolazi do razvoja reakcije preosetljivosti.

Provokacije jesu ponovljeno izlaganje ispitivanoj supstanci prethodno tretirane životinje nakon faze indukcije kako bi se odredilo da li jedinka razvija preosetljivost.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Osetljivost i pouzdanost eksperimentalne metode ispitivanja koja se koristi proverava se svakih šest meseci primenom supstanci za koje je poznato da imaju svojstvo blage do srednje senzibilizacije kože.

U dobro obavljenom ispitivanju, pozitivan odgovor od najmanje 30% kod metode ispitivanja sa adjuvansom ili 15% kod metode ispitivanja bez adjuvansa očekuje se za supstance koje izazivaju slabu do umerenu senzibilizaciju.

Preporučuju se sledeće supstance:

Tabela 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| CAS broj | EINECS broj | EINECS nazivi | Uobičajeni nazivi |
| 101 -86 -0 | 202 -983-3 | α-heksilcinamaldehid | α-heksilcinamaldehid |
| 149 -30 -4 | 205 -736-8 | benzotiazol-2-tiol | kaptaks |
| 94-09-7 | 202 -303-5 | benzokain | norkain |

Postoje okolnosti u kojima se mogu koristiti druge kontrolne supstance koje zadovoljavaju navedene kriterijume, ako se navede adekvatno opravdanje za njihovu upotrebu.

*1.4. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Ispitivane životinje početno se izlažu ispitivanoj supstanci putem intradermalnih injekcija odnosno epidermalnom primenom (indukcija). Nakon perioda pauze u trajanju od 10 do 14 dana (nakon faze indukcije), tokom koga može doći do razvoja imunološkog odgovora, životinje se izlažu drugoj, ponovljenoj dozi. Stepen prouzrokovane reakcije na koži nakon provokacije kod eksperimentalnih životinja poredi se sa onom reakcijom kod životinja iz kontrolne grupe koje su bile podvrgnute lažnom tretmanu indukcije, i koje su bile podvrgnute provokaciji.

*1.5. OPIS METODE ISPITIVANJA*

Ako je potrebno uklanjanje ispitivane supstance, ona se uklanja pomoću vode ili odgovarajućeg rastvarača tako da se ne utiče na nalaz na koži ili da se ne naruši integritet epidermisa.

**1.5.1. Test maksimizacije na zamorcima (GMPT)**

*1.5.1.1. Priprema*

Zdravi, mladi albino zamorci drže se radi privikavanja najmanje pet dana pre početka ispitivanja u eksperimentalnim uslovima. Pre ispitivanja, slučajnim izborom životinja, formiraju se grupe za tretman. Uklanjanje dlake sa kože životinja vrši se šišanjem, brijanjem ili hemijskom depilacijom, u zavisnosti od primenjene metode ispitivanja. Pazi se da u proceduri ne dođe do oštećenja kože. Telesna masa životinja meri se pre početka ispitivanja i na kraju ispitivanja.

*1.5.1.2. Uslovi ispitivanja*

1.5.1.2.1. Eksperimentalne životinje

Koriste se uobičajene vrste albino zamoraca.

1.5.1.2.2. Broj i pol

Koriste se mužjaci ili ženke. Ako se koriste ženke, ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne.

Minimum 10 životinja koristi se u tretiranoj grupi i najmanje 5 životinja u kontrolnoj grupi. Kada se koristi manje od 20 tretiranih i 10 kontrolnih zamoraca, i kada nije moguće zaključiti da li ispitivana supstanca dovodi do senzibilizacije, preporučuje se ispitivanje na dodatnim životinjama kako bi se dostigao ukupan broj od najmanje 20 tretiranih i 10 kontrolnih životinja.

1.5.1.2.3. Dozni nivoi

Koncentraciju ispitivane supstance koja se koristi za indukciju životinje treba dobro da podnose u smislu sistemskih efekata, i treba da bude najveća moguća doza koje će dovesti do slabe ili srednje izražene iritacije kože. Koncentracija koja se koristi za provokaciju treba da bude najveća moguća koja ne dovodi do iritacije kože. Odgovarajuće koncentracije najbolje je odrediti u pilot ispitivanju na dve ili tri životinje, ako drugi podaci nisu dostupni. U ovu svrhu, može se razmotriti i korišćenje FCA-tretiranih životinja.

*1.5.1.3. Postupak*

1.5.1.3.1. Indukcija

Dan 0 - tretirana grupa:

Tri para intradermalnih injekcija zapremine 0,1 mL daju se u području ramenog regiona koje je prethodno obrijano tako da se po jedna injekcija primeni sa svake strane tela.

Injekcija 1: 1:1 smeša (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Injekcija 2: ispitivana supstanca u određenoj koncentraciji u odgovarajućem vehikulumu.

Injekcija 3: ispitivana supstanca u određenoj koncentraciji pripremljena kao 1:1 smeša (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

U injekciji 3 supstance rastvorljive u vodi rastvaraju se u vodenoj fazi pre mešanja sa FCA. Supstance rastvorljive u lipidnoj fazi ili potpuno nerastvorne suspenduju se u FCA pre mešanja sa vodenom fazom. Završna koncentracija ispitivane supstance mora biti jednaka onoj korišćenoj u injekciji 2.

Injekcije 1 i 2 daju se jedna pored druge blizu glave, dok se injekcija 3 daje u ivični deo ispitivane površine.

Dan 0 - kontrolna grupa:

Tri para intradermalnih injekcija zapremine 0,1mL daju se u isto područje kao kod tretiranih životinja.

Injekcija 1: 1:1 smeša (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Injekcija 2: nerazređeno pomoćno sredstvo.

Injekcija 3: 50% m/v formulacija vehikuluma u 1:1 smeši (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Dan 5-7 - tretirane i kontrolne grupe:

Ako ispitivana supstanca nije iritans, nakon šišanja odnosno brijanja i to otprilike 24 sata pre topikalne primene, na površinu kože nanosi se 0,5 mL 10% natrijum lauril sulfata u vazelinu, kako bi se izazvala lokalna iritacija kože.

Dan 6-8 - tretirana grupa:

Sa tretiranog dela kože ponovo se uklanja dlaka. Na filter papir veličine 2 cm x 4 cm nanese se u debelom sloju ispitivana supstanca rastvorena u odgovarajućem vehikulumu i drži u kontaktu sa kožom uz pomoć okluzivnog zavoja narednih 48 sati. Izbor vehikuluma potrebno je obrazložiti. Čvrste supstance se pre primene usitne do praha i suspenduju u odgovarajućem vehikulumu. Tečnosti se mogu primeniti i nerazblažene.

Dan 6-8 - kontrolna grupa:

Sa površine kože koja se ponovno tretira uklanja se dlaka. Zatim se samo vehikulum, bez ispitivane supstance, nanosi na kožu uz pomoć okluzivnog zavoja i drži u kontaktu sa kožom narednih 48 sati.

1.5.1.3.2. Provokacija

Dan 20-22 - tretirane i kontrolne grupe:

Sa bokova životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa uklanja se dlaka. Na jedan bok svake životinje nanosi se obloga dobro natopljena ispitivanom supstancom, a na drugi bok obloga natopljena vehikulumom. Obloge se drže u kontaktu sa kožom naredna 24 sata pomoću okluzivnog zavoja.

1.5.1.3.3. Posmatranja i ocenjivanje: tretirane i kontrolne grupe

Približno 21 sat nakon uklanjanja obloga sa mesta provokacije, koža na tom mestu se, po potrebi, čisti i ponovo brija ili depilira.

Približno 3 sata kasnije (48 sati od početka provokacije) posmatraju se reakcije na koži i ocenjuju prema kriterijumima i ocenama datim u Delu drugom ove metode.

Približno 24 sata nakon prve ocene (nakon ukupno 72 sata) obavlja se i drugo posmatranje reakcija na koži i beleži se ocena.

Preporučuje se nasumično ocenjivanje životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa.

Ako je potrebno pojasniti rezultate dobijene nakon prve provokacije, može se obaviti i druga provokacija, i to nakon približno nedelju dana, sa odgovarajućom novom kontrolnom grupom. Druga provokacija može se obaviti i na životinjama iz originalne kontrolne grupe. Sve reakcije na koži kao i neuobičajeni nalazi, uključujući sistemske reakcije, koji su posledica indukcije ili provokacije ispitivanom supstancom beleže se i ocenjuju prema Magnusson/Kligman skali (videti Deo drugi ove metode). Drugi postupci, kao što su histopatološka ispitivanja, merenja debljine kože i sl., mogu se obaviti kako bi se razjasnile nedovoljno jasne reakcije.

**1.5.2. Buehler test**

*1.5.2.1. Priprema*

Zdravi, mladi albino zamorci drže se radi privikavanja najmanje pet dana pre početka ispitivanja u eksperimentalnim uslovima. Pre ispitivanja, nasumičnim izborom, životinje se razvrstavaju u grupe za tretman. Uklanjanje dlake sa kože životinja vrši se šišanjem, brijanjem ili hemijskom depilacijom, u zavisnosti od primenjene metode ispitivanja. Pazi se da ne dođe do oštećenja kože. Telesna masa životinja meri se pre početka ispitivanja i na kraju ispitivanja.

*1.5.2.2. Uslovi ispitivanja*

1.5.2.2.1. Eksperimentalne životinje

Koriste se već uobičajene vrste albino zamoraca.

1.5.2.2.2. Broj i pol

Koriste se mužjaci ili ženke. Ako se koriste ženke, ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne.

Minimum 20 životinja koristi se u tretiranoj grupi i najmanje 10 životinja u kontrolnoj grupi.

1.5.2.2.3. Dozni nivoi

Koncentracija ispitivane supstance koja se koristi pri indukciji mora biti najveća moguća koja će prouzrokovati blagu, ali ne prekomernu iritaciju kože. Koncentracija koja se koristi za provokaciju mora biti najveća koncentracija koja ne izaziva iritaciju kože. Ako je potrebno, odgovarajuća koncentracija može se odrediti iz probnog ispitivanja na dve ili tri životinje.

U slučaju ispitivanih supstanci koje su rastvorljive u vodi, najbolje je koristiti vodu ili razblaženi nenadražujući surfaktant kao vehikulum. U slučaju drugih ispitivanih supstanci za indukciju preporučuje se korišćenje smeše 80% etanol/voda, a za provokaciju aceton.

*1.5.2.3. Postupak*

1.5.2.3.1. Indukcija

Dan 0 - tretirana grupa:

Sa jednog boka životinje šišanjem se uklanja dlaka. Sistem "patch" testa se priprema sa ispitivanom supstancom rastvorenom u odgovarajućem vehikuklumu (izbor vehikuluma potrebno je obrazložiti; ispitivane supstance u tečnom stanju mogu se primeniti i nerazblažene).

"Patch" sistem sa ispitivanom supstancom primenjuje se na površinu kože uz pomoć okluzivnog zavoja i drži u kontaktu s kožom narednih 6 sati.

U ovoj vrsti ispitivanja koristi se okluzivni zavoj, a kao obloga može poslužiti okrugao ili kvadratni komadić pamučne gaze, površine 4 cm2-6 cm2. Kako bi se sprečilo da životinja skine oblogu, može se na mesto primene staviti odgovarajuća prepreka ili dodatni zavoj. U slučaju korišćenja dodatnog zavoja, možda će biti potrebno ponoviti tretman.

Dan 0 - kontrolna grupa:

Sa jednog boka životinje brija se koža. Na oblogu se nanosi samo vehikulum koje se potom pomoću zavoja drži u kontaktu sa kožom narednih 6 sati, kao i u slučaju životinja iz ispitivane grupe.

Dani 6-8 i 13-15 - tretirane i kontrolne grupe:

Na dane 6-8 i 13-15 primena ispitivane supstance obavlja se na istom mestu na boku životinje kao i na dan 0 (po potrebi, dlaka se ponovno uklanja).

1.5.2.3.2. Provokacija

Dani 27-29 - tretirane i kontrolne grupe:

Sa netretiranog boka životinja iz ispitivane i kontrolne grupe brijanjem se uklanja dlaka. Na tako pripremljen deo kože stavlja se okluzivni zavoj sa oblogom na koji je prethodno naneta odgovarajuća količina ispitivane supstance u najvećoj mogućoj koncentraciji koja neće izazvati iritaciju kože.

Kada je neophodno, okluzivni zavoj koji sadrži samo vehikulum takođe se nanosi na kožu netretiranog boka životinja iz ispitivane i kontrolne grupe. Obloge se drže u kontaktu s kožom narednih 6 sati.

1.5.2.3.3. Posmatranje i stepenovanje

Približno 21 sat nakon uklanjanja obloge sa mesta provokacije uklanja se dlaka sa kože na tom mestu.

Približno 3 sata kasnije (tj. približno 30 sati nakon provokacije) posmatraju se reakcije na koži i ocenjuju prema kriterijumima i ocenama datim u Delu drugom ove metode.

Otprilike 24 sata nakon prve ocene (približno 54 sata nakon provokacije) obavlja se i drugo posmatranje reakcija na koži, i beleže ocene.

Preporučuje se nasumično ocenjivanje životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa.

Ako je potrebno dodatno pojasniti rezultate dobijene nakon prve provokacije, obavlja se i druga provokacija, i to nakon približno nedelju dana, sa odgovarajućom novom kontrolnom grupom.

Druga provokacija može se obaviti i na životinjama iz originalne kontrolne grupe

Sve reakcije na koži kao i neuobičajeni nalazi, uključujući sistemske reakcije koje su posledica indukcije ili provokacije ispitivanom supstancom beleže se i ocenjuju prema Magnusson/Kligman skali (videti Deo drugi ove metode). Drugi postupci, kao što su histopatološka ispitivanja, merenja debljine kože i sl., mogu se obaviti kako bi se objasnile nedovoljno jasne reakcije.

**2. PODACI (GPMT i Buehler test)**

Podaci se prikazuju tabelarno. Za svaku životinju navode se uočene reakcije na koži pri svakom posmatranju.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU (GPMT i Buehler test)**

Ako se skrining ispitivanje obavlja pre ispitivanja na zamorcima, daje se opis obavljenog ispitivanja ili se poziva na preporuku (Mouse Ear Swelling Test, MEST) i iznose se detalji postupka zajedno sa rezultatima dobijenim u sklopu ispitivanja obavljenih sa ispitivanom i referentnom supstancom.

Pisanje izveštaja (GPMT i Buehler test)

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- soj zamoraca;

- broj, starost i pol životinja;

- poreklo, uslove smeštaja, ishrane, itd.;

- telesnu masu pojedinačnih životinja na početku ispitivanja.

2. Podatke o uslovima ispitivanja:

- način pripreme kože;

- detaljan opis pripreme flastera i obloga;

- rezultate probnog ispitivanja sa zaključkom o koncentracijama koje će se koristiti za indukciju i provokaciju;

- detalje pripreme ispitivane supstance, njene primene na kožu i uklanjanja;

- obrazloženje za izbor vehikuluma;

- koncentracije ispitivane supstance i vehikuluma za indukciju i provokaciju, kao i ukupnu količinu primenjene ispitivane supstance u indukciji i provokaciji.

3. Rezultate:

- kratak pregled rezultata posljednjeg ispitivanja senzibilizacije i pouzdanosti (videti odeljak 1.3. ove metode) uključujući podatke o ispitivanoj supstanci, koncentraciji i vehikulumu;

- pojedinačno prikazane za svaku životinju uključujući i sistem ocenjivanja;

- opis vrste i stepena ozbiljnosti uočenih efekata na koži;

- sve histopatološke nalaze.

4. Tumačenje rezultata.

5. Zaključke.

**4. LITERATURA**

Ova metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD TG 406.

**Deo drugi**

**MAGNUSSON/KLIGMAN SKALA ZA OCENU REAKCIJA USLED PROVOKACIJE ISPITIVANOM SUPSTANCOM "PATCH" TESTOM**

0 nema vidljivih promena

1 diskretan ili mestimičan (nehomogen) eritem

2 srednje izražen i raširen eritem

3 izražen eritem i otok

**B.7. AKUTNA (ORALNA) TOKSIČNOST (28 DANA)   
- PONOVLJENE DOZE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Ispitivana supstanca primenjuje se peroralno u rastućim dozama na nekoliko različitih grupa eksperimentalnih životinja. Na jednu grupu životinja primenjuje se jedna doza tokom 28 dana. Tokom primene ispitivane supstance životinje se posmatraju svakodnevno kako bi se zabeležili znakovi toksičnosti. Životinje koje uginu tokom ispitivanja podvrgavaju se postmortalnom pregledu, a na kraju eksperimenta i preživele životinje se lišavaju života na human način i podvrgavaju postmortalnom pregledu.

Ova metoda ispitivanja stavlja veći naglasak na neurološke efekte i potrebu za pažljivim kliničkim posmatranjem životinja kako bi se prikupilo što više podataka. Metoda ispitivanja je razvijena kako bi omogućila identifikaciju hemikalija s neurotoksičnim potencijalom, koje zahtevaju dodatna ispitivanja ovog aspekta. Pored toga, metoda ispitivanja može ukazivati i na imunološke efekte ispitivane supstance kao i na toksičnost po reprodukciju.

*1.4. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.4.1. Priprema**

Zdrave mlade odrasle jedinke nasumično se grupišu u ispitivane i kontrolnu grupu. Kavezi su takvi da se mogući efekti smeštaja svedu na minimum. Životinje se obeležavaju i drže u kavezima najmanje pet dana pre početka ispitivanja kako bi se prilagodile na laboratorijske uslove.

Ispitivana supstanca dozira se ili putem hrane ili putem vode za piće ili direktno, sondom u želudac. Metoda oralne primene zavisi od cilja studije i od fizičko-hemijskih svojstava supstance.

Kada je potrebno ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje se, kad god je moguće, primena vodenog rastvora/suspenzije, a tek zatim rastvora ili emulzije u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili nekom drugom sredstvu. Ako se koristi vehikulum koje nije voda, kod tumačenja rezultata uzimaju se u obzir i potencijalni toksični efekti tog vehikuluma. Potrebno je odrediti i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Eksperimentalne životinje*

Preporučuje se korišćenje mladih, zdravih pacova i to sojeva koji se najčešće koriste u laboratorijskim eksperimentima. Moguće je koristiti i druge glodare. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Doziranje je najbolje započeti odmah nakon prestanka sisanja, a u svakom slučaju pre nego što životinje navrše devet nedelja.

Na početku ispitivanja raspon telesnih masa pojedinačnih životinja ne treba da prelazi ± 20% od srednje vrednosti za svaki pol.

Kada se ispitivanje sa ponovljenim oralnim dozama obavlja kao prethodno za dugoročne studije, životinje istog soja i iz istog izvora koriste se u oba ispitivanja.

*1.4.2.2. Broj i pol*

Najmanje 10 životinja (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaki dozni nivo. Ako se u toku eksperimenta planiraju privremena lišavanja života na human način, broj životinja u eksperimentu povećava se za broj koji se planira da se liši života u toku ispitivanja.

Dodatno, prateća grupa od 10 životinja (po pet svakog pola) može se izlagati visokim dozama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabeležila reverzibilnost, postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata. Potrebno je uključiti i grupu od 10 kontrolnih životinja (ponovo po pet životinja svakog pola).

*1.4.2.3. Dozni nivoi*

Koristite se najmanje tri tretirane grupe, zajedno sa istovremenom kontrolnom grupom. Osim što se životinjama u kontrolnim grupama ne daje ispitivana supstanca, sa životinjama se postupa identično kao sa životinjama iz tretiranih grupa. Ako je korišćen vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvećoj korišćenoj zapremini.

Ako se procenom postojećih podataka, za ispitivanu supstancu u koncentraciji od 1.000 mg/kg TM/dan, ne očekuju nikakvi efekti, preporučuje se obavljanje ispitivanja granične doze. Ako ne postoje odgovarajući podaci za takvu procenu, može se sprovesti ispitivanje sa ciljem određivanja doza koje će se primeniti.

Doze ispitivane supstance biraju se uzimajući u obzir toksikološke ili toksikokinetičke podatke koji već postoje za ispitivanu supstancu ili strukturno slične supstance. Najveća doza bira se tako da izazove toksični efekat, ali ne i smrt ili tešku patnju životinja. Potom se redom biraju opadajuće koncentracije sa ciljem demonstriranja efekata vezanih za primenjenu dozu sve dok se ne dođe do doze bez štetnog efekta, tj. "no-observed-adverse-effects-level" (NOAEL). Doze se smanjuju progresivno za faktor dva do četiri puta, a dodatak četvrte ispitivane doze preporučuje se umesto korišćenja veoma velikih intervala (npr. većih od faktora 10) između doza.

Za supstance koje se doziraju putem hrane ili vode za piće, važno je prethodno proveriti da količina ispitivane supstance dodata u obrok ne utiče štetno na ishranu ili ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca dodaje hrani, ona se primenjuje ili u konstantnoj koncentraciji (ppm) ili u konstantnoj dozi izraženoj u jedinicama po telesnoj masi životinje. U svakom slučaju potrebno je propisati odabrani način doziranja. Ako se supstanca primenjuje putem sonde u želudac, doziranje se obavlja približno u isto vreme svaki dan, i podešava se po potrebi kako bi se održao konstantan dozni nivo u odnosu na telesnu masu životinje.

Kada se ispitivanje sa ponovljenom dozom obavlja kao prethodno za dugotrajne studije, potrebno je u oba ispitivanja koristiti sličnu ishranu.

*1.4.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ako ispitivanje doze od 1.000 mg/kg TM/dan, ili ekvivalentne doze u slučaju primene putem vode za piće ili hrane (preračunato iz vrednosti za telesnu masu) ne dovodi ni do kakvih toksičnih efekata, i ako se toksični efekti ne očekuju iz podataka za strukturno slične supstance, nije potrebno obaviti kompletno ispitivanje sa sve tri doze. Ispitivanje granične doze primenjuje se u svim slučajevima, osim u onim gde predviđena izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi ne zahteva primenu veće doze.

*1.4.2.5. Vreme posmatranja*

Vreme posmatranja je 28 dana. Životinje iz prateće grupe koje su predviđene za naknadna posmatranja zadržavaju se još najmanje dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se uočila postojanost toksičnih efekata, odložena pojava efekata ili oporavak od istih.

**1.4.3. Postupak**

Životinje se doziraju sa ispitivanom supstancom svaki dan, sedam dana u nedelji, tokom perioda od 28 dana, a primena petodnevnog režima doziranja dodatno se obrazlaže. U slučaju doziranja putem sonde, ispitivana supstanca se primenjuje u jednoj dozi direktno u želudac, nakon intubiranja. Maksimalna zapremina tečnosti koji se može u jednom doziranju primeniti zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme da pređe 1 mL/100 g TM životinje, izuzev u slučajevima kad se koriste vodeni rastvori i kada je dozvoljeno primeniti 2 mL/100 g TM životinje. Variranje zapremine ispitivane supstance potrebno je minimizirati prilagođavanjem koncentracije za svaku dozu, kako bi se obezbedila primena istih zapremina pri svim doznim nivoima.

*1.4.3.1. Opšta posmatranja*

Klinička posmatranja životinja obavljaju se najmanje jednom dnevno, ako je moguće u isto vreme svakog dana uzimajući u obzir očekivano vreme maksimalnog efekta nakon doziranja. Beleži se i zdravstveno stanje životinja. Najmanje dva puta dnevno vodi se beleška o smrtnosti ili životinjama na samrti. Životinje na samrti ili životinje koje trpe izrazitu patnju i bol uklanjaju se iz daljeg ispitivanja lišavanjem života na human način, i podvrgavaju se postmortalnom pregledu.

Jedanput pre inicijalnog izlaganja ispitivanoj supstanci (kako bi se omogućilo poređenje unutar grupe životinja), i najmanje jednom nedeljno nakon toga, obavljaju se detaljna klinička posmatranja svih životinja. Ova posmatranja najbolje je obaviti izvan kaveza u kome se životinja inače nalazi, i, ako je moguće, svaki put u isto vreme. Nalazi se pažljivo beleže i pomoću sistema ocenjivanja koji je definisala laboratorija koja vrši ispitivanja. Promene u uslovima ispitivanja treba da budu minimalne, a nalaze da beleže objektivni posmatrači koji nisu upućeni u detalje ispitivanja na životinjama. Beleže se promene na koži, krznu, očima, sluznici, kao i pojava sekreta/izlučevina i obeležja autonomne aktivnosti (npr. suzenje, piloerekcija, veličina zenice, neuobičajen način disanja). Potrebno je posmatrati i promene u hodu, držanju ili promene uzrokovane rukovanjem životinjama, kao i prisutnost toničko-kloničnih pokreta i stereotipnog ponašanja (npr. preterano čišćenje, hodanje u krug) ili bizarnog ponašanja (npr. samopovređivanje, hodanje unazad).

U četvrtoj nedelji izlaganja ispitivanoj supstanci utvrđuje se reagovanje životinja na spoljne nadražaje različite prirode (npr. auditorne, vizuelne, proprioceptivne), procenu jačine stiska, i motornu aktivnost. Detalji o preporučenim postupcima dati su u literaturi (videti Opšti uvod).

Funkcionalna posmatranja obavljena u četvrtoj nedelji izlaganja mogu se izbeći kad se ispitivanje obavlja kao prethodna studija subhroničnom (90-dnevnom) ispitivanju. U tom slučaju, funkcionalna posmatranja mogu biti deo ovog dugotrajnijeg ispitivanja. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim posmatranjima izvedenih iz ispitivanja sa ponavljanim dozama omogućava lakši izbor doza za naknadno subhronično ispitivanje.

Izuzetno, funkcionalna posmatranja se mogu izbeći kod onih grupa životinja koje pokazuju znakove toksičnosti u meri koja značajno ometa obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

*1.4.3.2. Telesna masa i potrošnja hrane/vode*

Telesna masa svih životinja meri se najmanje jednom nedeljno. Potrošnja hrane i vode beleži se najmanje jednom nedeljno. Ako se ispitivana supstanca daje putem vode za piće, vodi se evidencija o potrošnji vode i to najmanje jedanput nedeljno.

*1.4.3.3. Hematološka ispitivanja*

Na kraju ispitivanja potrebno je uraditi sledeća hematološka ispitivanja: odrediti hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i diferenciranih leukocita, broj trombocita, kao i koagulabilnost.

Uzorci krvi uzimaju se sa određenog mesta neposredno pre ili za vreme lišavanja života na human način, i čuvaju pod odgovarajućim uslovima.

*1.4.3.4. Kliničko-biohemijska ispitivanja*

Kliničko-biohemijska ispitivanja krvi obavljaju se sa ciljem ispitivanja toksičnih efekata u tkivima, posebno u jetri i bubrezima, i to na uzorcima krvi svih eksperimentalnih životinja neposredno pre ili za vreme lišavanja života na human način (osim onih koje su već pronađene mrtve ili koje su lišene života na human način u međuvremenu). Pre uzimanja uzoraka krvi**I** preporučuje se uskraćivanje hrane životinjama preko noći. Ispitivanja u plazmi ili serumu uključuju i određivanje natrijuma, kalijuma, glukoze, ukupnog holesterola, uree, kreatinina, ukupnih proteina i albumina, i aktivnosti najmanje dva enzima kao indikatora hepatocelularnih efekata (kao što su: alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama glutamil transpeptidaza i sorbitol dehidrogenaza). Mogu se obaviti i merenja aktivnosti drugih enzima (enzimi jetre ili nekog drugog porekla) kao i žučnih kiselina što može pod određenim okolnostima obezbediti korisne informacije.

Neobavezno, tokom poslednje nedelje ispitivanja, mogu se obaviti i sledeći pregledi urina sakupljenog u određenom vremenu: odrediti izgled, zapreminu, osmolalnost ili specifičnu gustinu, pH, proteine, glukozu i prisutnost krvi/krvnih ćelija u urinu.

Razmatra se mogućnost određivanja serumskih markera koji ukazuju na opšte oštećenje tkiva. Ako se sumnja da ispitivana supstanca deluje na metaboličke procese, obavljaju se i druga određivanja, kao što su određivanje koncentracije kalcijuma, fosfora, triglicerida, nivoa specifičnih hormona, methemoglobina, i aktivnost holinesteraze. Svi ovi parametri određuju se pri ispitivanju hemikalija iz određenih klasa, tj. u određenim slučajevima.

Preporučuje se fleksibilan pristup koji zavisi od vrste ispitivane životinje odnosno očekivanog efekta date supstance.

Ako ne postoje adekvatni podaci o kontrolnim vrednostima parametara iz prethodnih ispitivanja, razmatra se potreba za određivanjem hematoloških i kliničko-biohemijskih parametara i pre nego što se započne sa doziranjem ispitivane supstance.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**I** Za određivanje brojnih parametara iz seruma i plazme, a najviše za određivanje glukoze, preporučuje se gladovanje preko noći. Glavni razlog tome je značajno veća varijacija vrednosti kao posledica uzimanja hrane koja bi mogla da maskira suptilne efekte i oteža tumačenje rezultata. S druge strane, gladovanje preko noći može uticati na opšti metabolizam životinja i, posebno u slučaju davanja ispitivane supstance putem hrane, poremetiti dnevnu izloženost ispitivanoj supstanci. Ako se usvoji gladovanje preko noći, kliničko-biohemijska ispitivanja potrebno je obaviti nakon izvođenja funkcionalnih posmatranja u četvrtoj nedelji ispitivanja.

*1.4.3.5. Postmortalni pregled*

Sve životinje koje se koriste u ispitivanju podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu, koja uključuje pažljiv pregled spoljašnje površine tela, uključujući sve otvore, lobanju, grudnu i trbušnu duplju. Jetru, bubrege, nadbubrežne žlezde, testise, semenike, timus, slezenu, mozak i srce svih životinja potrebno je odvojiti od okolnog tkiva, i što je pre moguće, vlažne izmeriti odmah nakon sekcije kako bi se izbeglo sušenje.

Sledeće vrste tkiva čuvaju se u medijumu za fiksiranje radi naknadnog izvođenja histopatoloških pregleda: sva vidljivo oštećena tkiva, mozak (reprezentativne regije, uključujući veliki mozak, mali mozak i produženu moždinu), kičmena moždina, želudac, tanko i debelo crevo (uključujući Pajerove ploče), jetra, bubrezi, nadbubrežne žlezde, slezina, srce, timus, štitna žlezda, dušnik, pluća (ubrizgavanjem fiksatora pa potom uranjanjem u isti medijum), polne žlezde, pomoćni polni organi (npr. materica, prostata), mokraćna bešika, limfni čvorovi (po mogućnosti, jedan uzet sa puta unosa ispitivane supstance u organizam, i drugi, udaljen od njega kako bi se proučili sistemski efekti), periferni nerv (n. ischiadicus ili n. tibialis), po mogućstvu smešten uz sam mišić, i isečak kostne srži (ili svež aspirat kostne srži). Klinički i drugi nalazi mogu uputiti na potrebu za ispitivanjem i drugih tkiva. Čuvaju se i svi organi koji se na osnovu saznanja o svojstvima ispitivane supstance smatraju ciljnim.

*1.4.3.6. Histopatološka ispitivanja*

Kompletna histopatološka ispitivanja obavljaju se na sačuvanim organima i tkivima svih životinja iz kontrolne grupe, i grupe izložene visokoj dozi ispitivane supstance. Ako se primete promene kod životinja na koje je primenjena visoka doza ispitivane supstance, histopatološka ispitivanja se obavljaju i na životinjama iz svih ostalih grupa.

Ispituju se sve veće (makroskopski vidljive) lezije.

Ako je korišćena pomoćna grupa, histopatološkoj obradi se podvrgavaju tkiva i organi na kojima su se kod tretiranih životinja primetile neke promene.

**2. PODACI**

Za svaku životinju vode se posebni podaci. Podaci se prikazuju tabelarno gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule ili su lišene života na human način za vreme ispitivanja (zajedno sa vremenom lišavanja života), kao i broj životinja kod kojih su pronađeni znakovi toksičnosti. Daje se i detaljan opis uočenih znakova toksičnosti, vreme kada su primećeni, njihovo vreme trajanja i stepen izraženosti, kao i broj životinja kod kojih su primećene lezije zajedno sa opisom tipa lezija i procentom životinja kod kojih su pronađene.

Kada je moguće, svi rezultati se analiziraju pomoću odgovarajuće statističke metode, koju je najbolje odabrati još u vreme planiranja ispitivanja.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

PISANJE IZVEŠTAJA

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- poreklo životinja, uslove smeštaja, ishrane itd.;

- individualne telesne mase životinja na početku ispitivanja, kasnije u nedeljnim intervalima i na kraju ispitivanja.

2. Podatke o uslovima ispitivanja:

- obrazloženje za izbor pomoćnog sredstva, ako se ne radi o vodi;

- razloge za izbor doze/koncentracije ispitivane supstance;

- detalje o formulaciji ispitivane supstance, ishrani, postignutoj koncentraciji ispitivane supstance, stabilnosti i homogenosti pripremljene formulacije;

- detalje o načinu primene ispitivane supstance;

- ukoliko je primenljivo, preračunavanja koncentracije ispitivane supstance primenjene hranom ili putem vode (ppm) na dozu (mg/kg TM/dan);

- detalje o kvalitetu hrane i vode.

3. Rezultate:

- telesnu masu/promene u telesnoj masi;

- konzumiranje hrane i vode;

- podatke o zabeleženim toksičnim efektima prikazane po polu i primenjenoj dozi ispitivane supstance;

- podatke o prirodi, težini i trajanju kliničkih promena (da li su reverzibilne ili nisu);

- procenu senzorne aktivnosti, jačina stiska i motorne aktivnosti;

- rezultate hematoloških ispitivanja, sa relevantnim kontrolnim vrednostima;

- rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja sa relevantnim kontrolnim vrednostima;

- telesnu masu pre lišavanja života na human način i masu pojedinačnih organa;

- nalaze postmortalnog pregleda;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- podatke o apsorpciji;

- statističku obradu rezultata, tamo gde je odgovarajuće.

4. Tumačenje rezultata.

5. Zaključke.

**4. LITERATURA**

Ova metoda ispitivanja oralne toksičnosti zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD TG 407.

**B.8. AKUTNA (INHALACIONA) TOKSIČNOST (28 DANA) - PONOVLJENE DOZE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Korisno je imati prethodne podatke o svojstvima ispitivane supstance kao što su: raspodela veličine čestica, pritisak pare, tačka topljenja, tačka ključanja, tačka paljenja i eksplozivnost (ako se radi o eksplozivnoj supstanci).

Videti Opšti uvod, Deo A.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod, Deo B.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Grupe eksperimentalnih životinja dnevno se izlažu rastućim koncentracijama ispitivane supstance tokom vremenskog perioda od 28 dana. Svaka grupa životinja izlaže se jednoj koncentraciji. Kada je neophodno, koristi se i vehikulum koji omogućava postizanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi. Za vehikulum se određuje i dodatna kontrolna grupa. Životinje se posmatraju svaki dan tokom vremena izlaganja ispitivanoj supstanci kako bi se uočili znakovi toksičnosti. Životinje koje uginu za vreme eksperimenta podvrgavaju se postmortalnom pregledu, a po završetku eksperimenta i preživele životinje se lišavaju života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.6.1. Priprema**

Životinje se drže u eksperimentalnim uslovima i hrane po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana pre početka ispitivanja. Pre ispitivanja zdrave mlade jedinke nasumce se grupišu u prethodno definisan broj eksperimentalnih grupa. Kada je neophodno, dodaje se vehikulum koji omogućava postizanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi. Odabrani vehikulum ne sme biti toksičan, što može da se potvrdi navodima postojeće literature.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Ako ne postoje kontraindikacije, preporučuje se korišćenje pacova i to sojeva koji se najčešće koriste u laboratorijskim ispitivanjima.

Na početku ispitivanja, raspon telesnih masa pojedinačnih životinja ne sme da pređe ± 20% od srednje vrednosti.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Najmanje 10 glodara (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaku ispitivanu koncentraciju. Ženke moraju biti takve da nisu ranije rađale i da nisu gravidne. Ako se u toku ispitivanja planiraju prevremena lišavanja života na human način, broj životinja u ispitivanju povećava se za broj koji je planiran za lišavanje života u toku ispitivanja. Prateća grupa od deset životinja (po pet životinja svakog pola) može se izlagati visokim koncentracijama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabeležile reverzibilnost, postojanost ili vremenski odložena pojava toksičnih efekata. Ukoliko se obavlja ovo posmatranje, uključuje se pomoćna grupa od 10 kontrolnih životinja (po pet svakog pola).

*1.6.2.3. Koncentracije*

Koriste se najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, zajedno sa odgovarajućim kontrolama (ako se koristi vehikulum, druga kontrola sadrži vehikulum u najvećoj datoj koncentraciji). Osim primene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao sa životinjama iz ispitivanih grupa. Najveća koncentracija ispitivane supstance treba da izazove toksične efekte, ali bez ili sa minimalnim brojem uginulih životinja. Najniža koncentracija ne treba da izazove toksične efekte. Kada je moguće predvideti izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi, najniža koncentracija primenjena na životinje treba da bude malo viša od ove vrednosti. Idealno, srednja koncentracija ispitivane supstance izaziva minimalne toksične efekte. Ako se koristi nekoliko srednjih koncentracija, tada su njihove vrednosti pravilno razmaknute kako bi se postigla gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primenjene niske ili srednje koncentracije ispitivane supstance, kao i u kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja treba da bude niska kako bi interpretacija rezultata imala smisla.

*1.6.2.4. Dužina izlaganja*

Trajanje izlaganja tokom jednog dana je šest sati. Drugi vremenski intervali mogu se definisati po potrebi.

*1.6.2.5. Oprema*

Životinje se podvrgavaju ispitivanju pomoću opreme kojom se može održavati konstantni protok vazduha sa najmanje 12 potpunih izmena u jednom satu, kako bi se obezbedila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnomerno raspoređena atmosfera. Kada se koristi komora, njen dizajn mora da bude dovoljno prostran da minimizira skučenost životinja i omogući maksimalnu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Kao opšte pravilo koje obezbeđuje stabilnost atmosfere u komori koristi se mera prema kojoj "zapremina" životinja ne sme da bude veća od 5% ukupne zapremine komore. Koriste se različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost čitavog tela, samo glave ili samo oro-nazalnih otvora životinje, a ove posljednje dve komore minimiziraju izloženost ispitivanoj supstanci nekim drugim putem unosa.

*1.6.2.6. Vreme posmatranja*

Eksperimentalne životinje posmatraju se svaki dan kako bi se uočili znakovi toksičnosti i to tokom trajanja čitavog eksperimenta kao i za vreme oporavka. Važno je zabeležiti vreme pojave ili nestanka prvih znakova trovanja, kao i vreme uginuća.

**1.6.3. Postupak**

Životinje se svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci, ili pet do sedam dana u nedelji, u vremenskom periodu od 28 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviđene za naknadna praćenja zadržavaju se dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se zabeležila postojanost toksičnih efekata ili oporavak.

Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje održava se na 22° C ± 3° C. Relativna vlažnost je između 30% i 70%, ali u nekim slučajevima (npr. kod ispitivanja aerosola) ovo nije izvodljivo. Održavanjem negativnog pritiska unutar komore (± 5 mm vode) sprečava se izlazak ispitivane supstance u okolinu. Za vreme izlaganja ispitivanoj supstanci životinjama se ne daje hrana i voda.

U toku ispitivanja koristi se odgovarajući dinamični sistem sa mogućnošću kontrole koncentracije ispitivane supstance. Za uspostavljanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance, preporučuje se obavljanje probnog ispitivanja. Komora je dizajnirana na takav način da omogućava homogenu distribuciju vazduha za vreme trajanja eksperimenta. Sistem mora da omogući stabilne uslove i njihovo uspostavljanje u što kraćem vremenskom periodu.

Sprovode se merenja i prate sledeći parametri:

a) brzina protoka vazduha (kontinuirano);

b) koncentracije ispitivane supstance u zoni udisanja. Tokom dnevnih izlaganja, koncentracija ispitivane supstance ne sme da varira više od ± 15% od srednje vrednosti. Kod aerosola se teško postiže ovakva kontrola doziranja, pa se u tom slučaju tolerišu veće razlike u vrednostima. Za vreme trajanja kompletnog ispitivanja, dnevne koncentracije su što je moguće stabilnije. Za aerosole se obavlja i analiza veličine čestica (najmanje jedanput nedeljno u svakoj grupi životinja);

v) temperatura i vlažnost (kontinuirano, ako je moguće).

Opažanja se beleže sistematično za vreme i nakon izlaganja. Svaka životinja ima poseban karton. Životinje se prate svaki dan, a znakovi trovanja beleže se redovno, uključujući vreme pojave, ozbiljnost i trajanje. Beleže se promene na koži i krznu, očima, sluznici, respiratornom, kardiovaskularnom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno određuje se telesna masa životinja i prati potrošnja hrane. Životinje se redovno prate kako bi se izbegao gubitak zbog kanibalizma ili autolize tkiva. Na kraju ispitivanja obavlja se postmortalni pregled svih preživelih životinja iz osnovnih (ne pratećih) ispitivanih grupa. Životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe i lišavaju života na human način, a potom se postmortalno pregledaju.

Sledeća ispitivanja sprovode se na kraju eksperimenta na svim životinjama, uključujući i one iz kontrolne grupe:

1) hematološka ispitivanja, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i pojedinih loza leukocita, kao i koagulabilnost krvi;

2) kliničko-biohemijska ispitivanja krvi uključujući najmanje jedan parametar koji ukazuje na funkciju jetre i bubrega: alanin aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat piruvat transaminaza), aspartat aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat oksaloacetat transaminaza), azot uree, albumin, kreatinin, ukupni bilirubin i proteini u serumu.

Druga ispitivanja koja mogu biti potrebna za adekvatnu evaluaciju toksičnosti uključuju određivanje kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze (u uslovima gladovanja), lipida, hormona, acido-baznu ravnotežu methemoglobin i aktivnost holinesteraze.

Dodatne biohemijske analize obavljaju se po potrebi, kako bi se detaljnije proučili toksični efekti.

*1.6.3.1. Postmortalni pregled*

Sve eksperimentalne životinje detaljno se postmortalno pregledaju. Odmah nakon sekcije mere se, još vlažni, sledeći organi: jetra, bubrezi, nadbubrežne žlezde, pluća i testisi. Organi i tkiva (respiratorni trakt, jetra, bubrezi, slezina, testisi, nadbubrežne žlezde i srce, kao i drugi organi na kojima se primete promene u veličini) čuvaju se u odgovarajućem medijumu za dalja histopatološka ispitivanja. Pluća se vade netaknuta, mere i stavljaju u odgovarajući fiksator kako bi sačuvala sve strukture.

*1.6.3.2. Histopatološka ispitivanja*

U kontrolnim grupama i grupama izloženim visokim koncentracijama ispitivane supstance obavljaju se histološka ispitivanja izolovanih organa i tkiva. Organi i tkiva koji pokažu oštećenja koja se mogu pripisati visokim koncentracijama ispitivane supstance detaljno se ispituju i kod životinja koje su bile izložene nižim koncentracijama. Životinje iz pratećih grupa takođe je potrebno histološki obraditi sa posebnom pažnjom na organima i tkivima koja su pokazala promene i kod životinja iz drugih ispitivanih grupa.

**2. PODACI**

Podaci se prikazuju tabelarno gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, kao i broj životinja kod kojih su pronađene promene.

Svi dobijeni rezultati analiziraju se pomoću odgovarajuće statističke metode. Koristi se bilo koja prihvaćena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ O REZULTATIMA**

*3.1. PISANJE IZVEŠTAJA*

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu, soj, poreklo, uslove čuvanja, ishrane, itd.

2. Podatke o uslovima ispitivanja:

- opis komore ili aparature uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za raspršivanje aerosola, metode za kondicioniranje vazduha i način čuvanja životinja u komori. Opisuje se i aparaturu za merenje temperature, vlažnosti, koncentracije aerosola i određivanje raspodele veličine čestica.

3. Podatke o izlaganju ispitivanoj supstanci:

- ovi podaci prikazuju se tabelarno u vidu srednjih vrednosti sa odstupanjima (standardna devijacija), a ako je moguće sadrže i podatke o:

a) brzini protoka vazduha kroz otvore u aparaturi;

b) temperaturi i vlažnosti vazduha;

v) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi kroz otvore u aparaturi, podeljenom sa zapreminom vazduha);

g) prirodi vehikuluma, ako je korišćen;

d) tačnoj koncentraciji supstance u zoni udisanja;

đ) srednjem masenom aerodinamičkom dijametru (MMAD) i geometrijskoj standardnoj devijaciji (GSD).

4. Podatke o nalazima o toksičnim efektima predstavljenim u odnosu na pol životinja i koncentraciju ispitivane supstance.

5. Vreme uginuća u toku eksperimenta, tj. da li su životinje preživele eksperiment.

6. Opis toksičnih i ostalih efekata; koncentraciju bez efekta.

7. Vreme pojave abnormalnosti i njihov kasniji tok.

8. Podatke o ishrani i telesnoj masi.

9. Podatke o hematološkim ispitivanjima i nalazima.

10. Rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja.

11. Nalaze postmortalnog pregleda.

12. Detaljan opis svih histopatoloških nalaza.

13. Statističku obradu rezultata gde je moguće.

14. Raspravu o rezultatima.

15. Tumačenje rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE*

Videti Opšti uvod, Deo G.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod, Deo D.

**B.9. AKUTNA (DERMALNA) TOKSIČNOST(28 DANA)   
- PONOVLJENE DOZE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod, Deo A.

*1.2. DEFINICIJA*

Videti Opšti uvod, Deo B.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Ispitivana supstanca primenjuje se svakodnevno na kožu životinja podeljenih u grupe u rastućim dozama. Na jednu grupu životinja primenjuje se jedna doza tokom perioda od 28 dana. Tokom primene ispitivane supstance životinje se svakodnevno posmatraju kako bi se beležili znakovi toksičnosti. Životinje koje uginu tokom ispitivanja postmortalno pregledaju se, a na kraju eksperimenta i preživele životinje se lišavaju života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.6.1. Priprema**

Životinje se drže u eksperimentalnim uslovima i hrane po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana pre početka ispitivanja. Pre ispitivanja, zdrave mlade životinje nasumce se dele u ispitivane i kontrolne grupe. Neposredno pre početka ispitivanja, životinjama se uklanja krzno sa dorzalnog dela tela. Krzno se može ukloniti i brijanjem, ali je u tom slučaju brijanje potrebno uraditi 24 sata pre ispitivanja. Šišanje i brijanje se ponavljaju jednom nedeljno. Kod uklanjanja krzna, pazi se da ne dođe do oštećenja kože. Za primenu ispitivane supstance čisti se najmanje 10% ukupne površine kože životinje. Kod procene površine i dimenzija kože koja se čisti uzima se u obzir i telesna masa životinje. Ako se ispituje čvrsta supstanca, koja se po potrebi može usitniti do praha, dobijeni prašak potrebno je dobro ovlažiti vodom ili nekim drugim vehikulumom kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Ako se koristi neki vehikulum, uzima se u obzir i njegov uticaj na prodiranje ispitivane supstance kroz kožu. Ispitivane supstance koje se već nalaze u tečnom obliku, najčešće se koriste nerazblažene. Ispitivana supstanca se primenjuje na kožu između pet do sedam dana nedeljno.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Za ovakav tip ispitivanja najčešće se koriste odrasli pacovi, kunići ili zamorci. Ako se koriste druge vrste laboratorijskih životinja, daje se obrazloženje za ovo korišćenje.

Na početku eksperimenta raspon telesnih masa životinja ne sme da prelazi ± 20% od odgovarajuće srednje vrednosti.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Najmanje 10 životinja (5 mužjaka i 5 ženki) sa zdravom kožom koriste se za svaku ispitivanu dozu. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako se u toku eksperimenta planiraju prevremena lišavanja života na human način, broj životinja u eksperimentu povećava se za broj koji se planira lišiti života u toku ispitivanja. Prateća grupa od 10 životinja (po pet svakog pola) može da se izloži visokim koncentracijama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabeležile reverzibilnost, postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata. Ukoliko se obavlja ovo posmatranje, uključuje se pomoćna grupa od 10 kontrolnih životinja (po pet svakog pola).

*1.6.2.3. Dozni nivoi*

Koriste se najmanje tri doze ispitivane supstance, zajedno sa odgovarajućim kontrolama (ako se koristi vehikulum, druga kontrola se izlaže vehikulumu). Vreme izlaganja je najmanje šest sati dnevno. Ispitivana supstanca nanosi se na kožu u približno isto vreme svakog dana, a naneta doza se prilagođava (jedanput ili dva puta nedeljno) promenama telesne mase životinje. Osim primene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se identično kao sa životinjama iz ispitivanih grupa. Ako se koristi vehikulum, kontrolna grupa životinja dozira se vehikulumom na isti način kao i ispitivana grupa kojoj je primenjena najveća doza. Najveća doza ispitivane supstance treba da izazove toksične efekte kod životinja, ali bez ili sa minimalnim brojem uginulih životinja. Najniža koncentracija ne treba da izazove toksične efekte.

Kada je moguće predvideti izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi, najniža koncentracija primenjena na životinje treba da bude malo viša od ove vrednosti. Idealno, srednja koncentracija ispitivane supstance izaziva minimalne toksične efekte. Ako se koristi nekoliko srednjih koncentracija, njihove vrednosti su pravilno raspoređene kako bi se postigla gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primenjene niske ili srednje koncentracije ispitivane supstance, kao i u kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja treba da bude niska kako bi tumačenje rezultata imalo smisla.

Ako primena ispitivane supstance izaziva tešku iritaciju kože, doze se smanjuju, što može uticati na smanjenje ili potpuni nestanak drugih toksičnih efekata kod visokih doza. Ako dođe do izrazitih oštećenja kože, preporučuje se okončavanje ispitivanja i početak novog ispitivanja sa nižim koncentracijama ispitivane supstance.

*1.6.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ako prethodno ispitivanje sa dozom od 1.000 mg/kg ili većom dozom u slučajevima kada se predviđa izloženost ljudi većoj dozi ne rezultira toksičnim efektima, nastavak ispitivanja smatra se nepotrebnim.

*1.6.2.5. Vreme posmatranja*

Eksperimentalne životinje posmatraju se svakog dana kako bi se uočili znakovi toksičnosti. Beleži se vreme pojave ili nestanka prvih znakova toksičnosti, kao i vreme uginuća.

**1.6.3. Postupak**

Životinje se drže u zasebnim kavezima. U idealnim uslovima, životinje se tretiraju sedam dana u nedelji, tokom perioda od 28 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviđene za naknadna praćenja zadržavaju se dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se zabeležila postojanost toksičnih efekata ili oporavak. Vreme izlaganja je najmanje šest sati dnevno.

Ispitivana supstanca primenjuje se ravnomerno preko čitave površine koja iznosi otprilike 10% od ukupne površine kože. U slučaju veoma toksičnih supstanci, izložena površina može biti i manja, ali je potrebno primenjeni sloj ravnomerno rasporediti u što je moguće tanjem sloju.

Tokom ispitivanja ispitivana supstanca se drži u kontaktu sa kožom pomoću porozne gaze i flastera koji ne izaziva iritaciju kože. Mesto primene dodatno se može prekriti kako bi se onemogućila ingestija ispitivane supstance. Ako je neophodno, životinji se stavljaju i dodatni štitnici kojima se sprečava direktan kontakt sa tretiranom kožom, ali se ne preporučuje kompletna imobilizacija životinje. Kao alternativa koristi se zaštitni okovratnik.

Nakon propisanog vremena izlaganja, višak ispitivane supstance uklanja se ispiranjem vodom ili pomoću nekog drugog sredstva za čišćenje kože.

Posmatranja se svakodnevno sistematično beleže. Beleže se znakovi toksičnosti, vreme njihove pojave, stepen i trajanje; promene na koži i krznu, očima, sluzokoži, respiratornom, kardiovaskularnom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno određuje se telesna masa životinja i beleže opažanja vezana za potrošnju hrane. Redovno se prate životinje kako bi se izbegao njihov gubitak zbog kanibalizma ili autolize tkiva. Na kraju eksperimenta, postmortalno pregledaju se sve preživele životinje iz osnovnih (ne pratećih) ispitivanih gupa. Životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe i lišavaju života na human način, a potom se postmortalno pregledaju.

Sprovode se sledeća ispitivanja na kraju eksperimenta na svim životinjama uključujući one iz kontrolne grupe:

1. hematološka ispitivanja, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i pojedinih loza leukocita, kao i brzinu zgrušavanja krvi;

2. kliničko-biohemijska ispitivanja krvi, uključujući najmanje jedan parametar koji ukazuje na funkciju jetre i bubrega: alanin aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat piruvat transaminaza), aspartat aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat oksaloacetat transaminaza), azot uree, albumin, kreatinin, ukupni bilirubin i proteini u serumu;

3. druga ispitivanja koja mogu biti potrebna za adekvatnu evaluaciju toksičnosti uključujući određivanje kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze (u uslovima gladovanja), lipida, hormona, acido-baznu ravnotežu, methemoglobin i aktivnost holinesteraze;

4. dodatne biohemijske analize obavljaju se po potrebi, kako bi se detaljnije proučili toksični efekti.

**1.6.4. Postmortalni pregled**

Sve eksperimentalne životinje detaljno se postmortalno pregledaju. Sledeći organi mere se odmah nakon sekcije, još vlažni: jetra, bubrezi, nadbubrežne žlezde, pluća i testisi. Organi i tkiva (respiratorni trakt, jetra, bubrezi, slezina, testisi, nadbubrežne žlezde i srce, kao i drugi organi na kojima se primete promene u veličini) čuvaju se u odgovarajućem medijumu za dalja histopatološka ispitivanja. Pluća se vade netaknuta, mere i stavljaju u odgovarajući fiksator kako bi se sačuvale sve strukture.

**1.6.5. Histopatološka ispitivanja**

U kontrolnim grupama i grupama izloženim visokim koncentracijama ispitivane supstance prave se histološka ispitivanja izolovanih organa i tkiva. Organi i tkiva koji pokažu oštećenja koja se mogu pripisati visokim koncentracijama ispitivane supstance detaljno se ispituju i kod životinja koje su bile izložene nižim koncentracijama. Životinje iz pratećih grupa takođe je potrebno histološki obraditi sa posebnim pažnjom na organe i tkiva koja su pokazala promene i kod životinja iz drugih ispitivanih grupa.

**2. PODACI**

Podaci se prikazuju tabelarno gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, kao i broj životinja kod kojih su pronađene promene.

Svi dobijeni rezultati analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Koristi se bilo koja prihvaćena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

*3.1. PISANJE IZVEŠTAJA*

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu, soj, poreklo, uslovi smeštaja, ishrana itd.

2. Podatke o uslovima ispitivanja (uključujući način primene, okluzivni ili ne-okluzivni).

3. Koncentracije ispitivane supstance u dozama (koncentracija vehikuluma, ako je korišćen).

4. Podatke o dozi bez štetnog efekta.

5. Podatke o toksičnim efektima, sortirane prema polu životinja i primenjenoj dozi ispitivane supstance.

6. Vreme smrti u toku eksperimenta, tj. da li su životinje preživele celi eksperiment.

7. Opis toksičnih ili drugih efekata.

8. Vreme opažanja bilo kakvih abnormalnosti, i njihov kasniji tok

9. Podatke o ishrani i telesnoj masi.

10. Podatke o hematološkim ispitivanjima i nalazima.

11. Rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja.

12. Nalaze postmortalnog pregleda.

13. Detaljan opis svih histopatoloških nalaza.

14. Statističku obradu rezultata kada je moguće.

15. Raspravu o rezultatima.

16. Tumačenje rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE*

Videti Opšti uvod, Deo G.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod, Deo D.

**B.10. MUTAGENOST - *IN VITRO* ISPITIVANJE HROMOZOMSKIH ABERACIJA KOD SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 473, *In vitro* ispitivanje hromozomskih aberacija (1997).

*1.1. UVOD*

Svrha *in vitro* ispitivanja hromozomskih aberacija je utvrđivanje agenasa koji uzrokuju strukturnu hromozomsku aberaciju u kulturi ćelija sisara**1, 2, 3**. Postoje dve vrste strukturnih aberacija: hromozomska i hromatidna. Sa većinom hemijskih mutagena izazvane aberacije su na hromatidama, ali može doći i do aberacija na hromozomima. Povećanje polipoidnosti može da ukaže na to da hemikalija ima potencijal za izazivanje numeričkih aberacija. Ova metoda nije namenjena za merenje numeričkih aberacija i ne koristi se rutinski u te svrhe. Hromozomske mutacije i s njima povezani efekti uzrok su mnogih genetskih oboljenja kod ljudi. Postoje dokazi da hromozomske mutacije i s njima povezani efekti koji izazivaju promene u onkogenima i tumor-supresorskim genima somatskih ćelija imaju ulogu u izazivanju kancera kod ljudi i eksperimentalnih životinja.

*In vitro* ispitivanje hromozomskih aberacija može da koristi: kulture utvrđenih ćelijskih linija, ćelijskih vrsta ili u prvom redu ćelijskih kultura. Ćelije se biraju na osnovu sposobnosti rasta u kulturi, stabilnosti kariotipa, hromozomskog broja, hromozomske h raznolikosti i spontane frekvencije hromozomskih aberacija.

Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* zahtevaju upotrebu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Ovaj sistem metaboličke aktivacije ne može u celini da oponaša *in vivo* uslove sisara. Vodi se računa da se izbegavaju uslovi koji dovode do pozitivnih rezultata, a koji ne odražavaju suštinsku mutagenost i koji mogu da nastanu usled promena u pH, osmolalnosti ili usled visokog nivoa citotoksičnosti**4, 5**.

Ovo ispitivanje koristi se za traženje mogućih mutagena i karcinogena za sisare. Mnoge supstance koje su pozitivne u ovom ispitivanju, karcinogene su za sisare. Uzajamna zavisnost između ovog ispitivanja i karcinogenosti nije besprekorna. Uzajamna zavisnost zavisi od hemijske klase. Sve je više dokaza da postoje karcinogeni koji se ne otkrivaju ovim ispitivanjem jer deluju mehanizmima koji su drugačiji od neposrednog oštećenja DNK.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Aberacija tipa hromatida jeste strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje između hromatida.

Aberacija tipa hromozoma jeste strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje hromatida na identičnom mestu.

Endoreduplikacija jeste proces kod kojeg nakon S faze DNK replikacije jezgro ne ulazi u mitozu, već započinje druga S faza. Rezultat procesa su hromozomi sa 4, 8, 16 i više hromatida.

"Gap" (prekid) jeste ahromatska lezija manja od širine jedne hromatide i sa minimalnom iskrivljenošću hromatida.

Mitotski indeks jeste odnos broja ćelija u metafazi i ukupnog broja ćelija koje su posmatrane u populaciji ćelija; odnosno mitotski indeks jeste mera stepena proliferacije te ćelijske populacije.

Numerička aberacija jeste promena u broju hromozoma u odnosu na normalan broj karakterističan za korišćene ćelije.

Poliploidija jeste pojava kada ćelija sadrži više od haploidnog broja hromozoma (n), osim kada sadrži diploidni broj hromozoma (tj. 3n, 4n, itd.).

Strukturna aberacija jeste promena u strukturi hromozoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom u metafazi ćelijske deobe, a koja se zapaža u vidu delecija i fragmentacija, translokacija ili inverzija.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ćelijske kulture izlažu se ispitivanoj supstanci uz metaboličku aktivaciju i bez nje. Nakon izlaganja ćelijskih kultura ispitivanoj supstanci, u prethodno određenim intervalima, ćelijske kulture se tretiraju supstancama koje prekidaju metafazu (npr. Colcemid® ili kolhicin); zatim se uzimaju, boje i mikroskopski se analiziraju ćelije u metafazi, odnosno ispituju se na prisutnost hromozomskih aberacija.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Preparati**

*1.4.1.1. Ćelije*

Mogu se koristiti različite ćelijske linije, sojevi ili primarne ćelijske kulture, uključujući humane ćelije (npr. fibroblasti kineskog hrčka, humani ili drugi limfociti periferne krvi sisara).

*1.4.1.2. Medijum (hranljive podloge) i uslovi kultivisanja*

Za održavanje kultura koriste se odgovarajuće hranljive podloge i uslovi inkubacije (posude, CO2 koncentracija, temperatura i vlažnost). Postojećim ćelijskim linijama i sojevima rutinski se proverava stabilnost u modalnom broju hromozoma i odsustvo kontaminacije mikoplazmom pri čemu se ćelijske linije i sojevi ne koriste ako su kontaminirani. Treba da budu poznati uobičajeno vreme ćelijskog ciklusa ćelije i uslovi kultivisanja koji se koriste.

*1.4.1.3. Priprema kultura*

Utvrđene ćelijske linije i sojevi: ćelije se umnožavaju od "stock" kultura, zasejavaju se u podlozi pri gustini koja je takva da se u kulturama ne dostigne konfluentnost pre vremena sakupljanja i inkubiraju se na temperaturi od 37° C.

Limfociti: puna krv tretirana sa antikoagulansom (npr. heparinom) ili izdvojeni limfociti dobijeni od zdrave životinje dodaju se podlozi koji sadrži mitogen (npr. fitohemaglutinin) i inkubiraju se na temperaturi od 37° C.

*1.4.1.4. Metabolička aktivacija*

Ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćeni sistem je post-mitohodrijalna frakcija sa kofaktorom (S9) pripremljena od jetre glodara tretiranih agensima koji indukuju enzime kao što su: Aroclor 1254**6, 7, 8, 9** ili smeša fenobarbitona i ß-naftoflavona**10, 11, 12**.

Post-mitohondrijalne frakcije obično se koriste u koncentracijama u opsegu od 1% v/v do 10% v/v u konačnoj podlozi. Uslovi metaboličke aktivacije mogu da zavise od klase hemikalije koja se ispituje. U nekim slučajevima prikladno je da se koristi više od jedne koncentracije post-mitohondrijalne frakcije.

Pojedina dostignuća, uključujući ćelijske linije dobijene genetskim inženjeringom kod kojih se javlja ekspresija specifičnih aktivirajućih enzima, mogu da omoguće potencijal za endogenu aktivaciju. Izbor korišćenih ćelijskih linija mora da bude naučno opravdan (npr. relevantnost izoenzima citohroma P450 za metabolizam ispitivane supstance).

*1.4.1.5. Ispitivana hemikalija*

Ispitivane supstance u čvrstom stanju, pre tretmana ćelija, rastvaraju se ili suspenduju u odgovarajućem rastvaraču ili vehikulumu i, ako je potrebno, razblažuju. Ispitivane supstance u tečnom stanju mogu da se dodaju neposredno u ispitivani sistem, odnosno mogu da se razblaže pre tretmana. Koriste se sveži preparati ispitivane supstance, osim ako podaci o stabilnosti pokazuju da se preparati mogu čuvati.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Vehikulum*

Vehikulum je takav da hemijski ne reaguje sa ispitivanom supstancom i da bude kompatibilan sa preživljavanjem ćelija i S9 aktivnošću. Ako se koristi vehikulum koji nije opštepoznat, njegova primena mora da bude obrazložena podacima koji potvrđuju njegovu kompatibilnost. Preporučuje se, kad god je moguće, da se u prvom redu koriste vodeni vehikulumi. Ako su ispitivane supstance nestabilne u vodi, organski rastvarači koja se koriste ne smeju da sadrže vodu. Voda može da se ukloni dodavanjem molekularnog sita.

*1.4.2.2. Koncentracije izlaganja*

Kriterijumi koji se razmatraju kod određivanja najviših koncentracija su: citotoksičnost, rastvorljivost u ispitivanom sistemu i promene pH ili osmolalnost.

Citotoksičnost se određuje sa i bez metaboličke aktivacije u glavnom eksperimentu uz korišćenje odgovarajuće indikacije za ćelijski integritet i rast, kao što je stepen združivanja, broj živih ćelija ili mitotski indeks. Korisno je da se u prethodnom eksperimentu odredi citotoksičnost i rastvorljivost.

Analizira se najmanje tri koncentracije. Koncentracije koje izazivaju citotoksičnost pokrivaju opseg od maksimalne do male toksičnosti ili bez toksičnosti; što obično znači da se koncentracije međusobno razlikuju najviše za faktor između √2 i √10. U vreme zrelosti najviša koncentracija mora da pokaže znatno smanjenje stepena združivanja, broja ćelija ili mitotskog indeksa (sve veće od 50%). Mitotski indeks je posredna mera citotoksičnih/citostatskih efekata i zavisi od vremena nakon tretmana. Mitotski indeks prihvatljiv je za suspenzije kultura kod kojih bi druge mere toksičnosti mogle da budu komplikovane i nepraktične. Podatak o kinetici ciklusa ćelije kao što je prosečno vreme generisanja (u daljem tekstu: AGT) može da se koristi kao dodatni podatak. AGT je srednja vrednost koja ne otkriva uvek postojanje subpopulacija, i čak i mali porasti prosečnog vremena generacije mogu da budu povezani sa vrlo bitnim kašnjenjem u vremenu optimalne produkcije aberacija.

Za supstance koje su relativno necitotoksične, najviša ispitivana koncentracija je 5 µL/mL, 5 mg/mL ili 0,01 M, zavisno od toga koja koncentracija je niža.

Za relativno nerastvorne supstance koje nisu toksične pri proizvodu koncentracija njenih jona nižem od proizvoda rastvorljivosti, najviša doza koja se koristi je iznad granice rastvorljivosti u konačnoj podlozi na kraju tretmana. U nekim slučajevima (npr. kad se toksičnost supstance pojavljuje samo pri proizvodu koncentracija jona višim od proizvoda rastvorljivosti), preporučuje se da se ispitivanje obavi sa više od jedne doze sa talogom. Procena rastvorljivosti na početku i na kraju tretmana može da bude od koristi, jer se rastvorljivost može menjati tokom izlaganja u sistemu ispitivanja usled prisutnosti ćelija, S9, seruma, itd. Talog može da se otkrije golim okom. Talog ne sme da utiče na ocenjivanje.

*1.4.2.3. Pozitivne i negativne kontrole*

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole, sa i bez metaboličke aktivacije, uključene su u svaki eksperiment. Ako se koristi metabolička aktivacija, pozitivne kontrolne hemikalije su one koje zahtevaju aktivaciju, kako bi dale mutageni odgovor.

Kod pozitivnih kontrola koristi se poznati klastogen i nivoi izloženosti kod kojih se očekuje dobijanje reproduktivnog povećanja u odnosu na kontrolu, što ukazuje na osetljivost ispitivanog sistema.

Koncentracije pozitivne kontrole treba da pokažu jasne efekte, ali da licu koje obavlja tumačenje rezultata ne bude odmah poznat identitet kodiranih slajdova.

Primeri supstanci za pozitivnu kontrolu:

Tabela 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Uslovi metaboličke aktivacije | Supstanca | CAS br. | EINEC br. |
| Odsustvo egzogene metaboličke aktivacije | Metil metansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| Etil metansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| Etil nitrozourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomicin S | 50-07-7 | 200-008-6 |
| 4-Nitrohinolin-N-oksid | 56-57-5 | 200-281-1 |
| Prisustvo egzogene metaboličke aktivacije | Benzo[a]piren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| Ciklofosfamid Ciklofosfamid monohidrat | 50-18-0 6055-19-2 | 200-015-4 |

Za pozitivnu kontrolu mogu da se koriste i druge supstance. Kada je moguće, razmatra se upotreba pozitivne kontrole koja je srodne klase ispitivanoj hemikaliji.

Negativne kontrole koje se sastoje samo od vehikuluma u podlozi za tretiranje i sa kojima se postupa na isti način kao i sa tretiranim kulturama, uključene su za svako vreme sakupljanja. Koriste se i netretirane kontrole, osim ako postoje podaci kontrole iz ranijih studija koji pokazuju da odabrani rastvarač ne izaziva nikakve štetne niti mutagene efekte.

**1.4.3. Postupak**

*1.4.3.1. Tretman ispitivanom supstancom*

Ćelije se tokom proliferacije tretiraju ispitivanom supstancom u prisustvu ili odsustvu sistema metaboličke aktivacije. Obrada limfocita počinje oko 48 sati nakon stimulacije mitoze.

*1.4.3.2.*

Za svaku koncentraciju obično se koriste kulture u duplikatu, a strogo se preporučuju za negativne kontrolne kulture odnosno kontrolne kulture vehikuluma. Kada na osnovu postojećih podataka mogu da se pokažu minimalne promene između kultura u duplikatu**13, 14** prihvatljivo je korišćenje jedne kulture za svaku koncentraciju.

Gasovite ili isparljive supstance se ispituju odgovarajućim metodama, npr. korišćenjem hermetički zatvorenih posuda za kultivisanje**15, 16**.

*1.4.3.3. Vreme sakupljanja kulture*

U prvom eksperimentu ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci 3 do 6 sati sa i bez metaboličke aktivacije, a uzorci se uzimaju posle približno 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa nakon početka tretmana**12**. Ako ovaj protokol da negativne rezultate i sa i bez aktivacije, obavlja se dodatni eksperiment bez aktivacije, sa neprekidnim tretmanom do uzorkovanja posle približno 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa. Određene hemikalije mogu se lakše otkriti kod vremena tretmana/uzorkovanja koje je duže od 1,5 dužine ciklusa. Negativni rezultati sa metaboličkom aktivacijom moraju da se potvrde u zavisnosti od slučaja. U slučajevima kada se potvrda negativnih rezultata ne smatra potrebnom, daje se obrazloženje.

*1.4.3.4. Priprema hromozoma*

Ćelijske kulture tretiraju se Colcemid®-om ili kolhicinom obično jedan do tri sata pre sakupljanja. Svaka ćelijska kultura sakuplja se i obrađuje posebno za pripremu hromozoma. Priprema hromozoma obuhvata: tretiranje ćelija hipotoničnim rastvorom, fiksaciju i bojenje.

*1.4.3.5. Analiza*

Svi slajdovi, uključujući one pozitivnih i negativnih kontrola, nezavisno se kodiraju pre mikroskopske analize. Postupci fiksacije često dovode do prekida proporcije metafaznih ćelija sa gubitkom hromozoma, pa procenjivane ćelije sadrže broj centromera koji je jednak modalnom broju ± 2 za sve vrste ćelija. Najmanje 200 dobro raspoređenih metafaza, podjednako podeljenih između duplikata, mora da se uoči po koncentraciji i kontroli. Taj broj može da bude i manji ako se uoči veliki broj aberacija.

Iako je svrha ispitivanja otkrivanje hromozomskih aberacija, važno je zabeležiti i poliploidiju i endoreduplikaciju, ukoliko se uoče.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Eksperimentalna jedinica je ćelija. Zbog ovoga se procenjuje procenat ćelija sa strukturnim hromozomskim aberacijama. Strukturno različite vrste hromozomskih aberacija upisuju se sa svojim brojevima i učestalostima za eksperimentalne i kontrolne kulture. Oštećenja se upisuju odvojeno i navode u izveštaju, ali generalno nisu uključena u ukupnu učestalost aberacija.

Istovremene mere citotoksičnosti za sve tretirane i negativne kontrolne kulture u glavnim ispitivanjima aberacija, takođe se beleže.

Navode se podaci o svakoj pojedinačnoj kulturi. Svi podaci se navode sažeto u tabeli.

Ne postoje zahtevi za potvrdu jasnog pozitivnog odgovora. Dvosmisleni rezultati se razjašnjavaju daljim ispitivanjem, ako je moguće modifikacijama eksperimentalnih uslova. Potreba za potvrđivanjem negativnih rezultata razmotrena je odeljku 1.4.3.3. ove metode. Za izvođenje daljih razmatra se modifikacija parametara ispitivanja za proširenje opsega procenjenih uslova. Parametri ispitivanja se mogu modifikovati obuhvataju opseg koncentracije i uslove metaboličke aktivacije.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za određivanje pozitivnog rezultata, kao što je povećanje zavisno od koncentracije ili reproducibilno povećanje broja ćelija sa hromozomskim aberacijama. Prvo se razmatra biološka relevantnost rezultata. Statističke metode mogu da se koriste kao pomoć u proceni rezultata ispitivanja**3, 13**. Statistički značaj ne može da bude jedini faktor koji određuje pozitivni odgovor.

Povećanje broja poliploidnih ćelija može da ukaže na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira procese mitoze i izazove numeričke hromozomske aberacije. Povećanje broja ćelija sa endoreduplikovanim hromozomima može da ukaže na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira progresiju ćelijskog ciklusa**17, 18**.

Ispitivana supstanca za koju rezultati ispitivanja ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume smatra se nemutagenom u ovom sistemu.

Iako većina eksperimenata daje jasne pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima dobijeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne procene aktivnosti ispitivane supstance. Rezultati mogu da ostanu dvosmisleni ili nejasni bez obzira na to koliko puta je eksperiment ponovljen.

Pozitivni rezultati iz *in vitro* ispitivanja aberacije hromozoma ukazuju da ispitivana supstanca izaziva strukturne aberacije hromozoma u kulturi somatskih ćelija sisara. Negativni rezultati ukazuju da, pod ispitivanim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva aberaciju hromozoma u kulturi somatskih ćelija sisara.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Vehikulumu:

- obrazloženje za izbor vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ako su poznati.

2) Ćelijama:

- vrsta i poreklo ćelija;

- kariotipne karakteristike i podesnost korišćene vrste ćelija;

- odsustvo mikoplazme, ako je primenljivo;

- podatak o dužini ćelijskog ciklusa;

- pol davaoca krvi, puna krv ili korišćeni odvojeni limfociti, mitogen;

- broj prolaza, ako je primenljivo;

- metode za održavanje kulture ćelije, ako je primenljivo;

- modalni broj hromozoma.

3) Uslovima ispitivanja:

- identitet supstance koja je korišćena za zaustavljanje metafaze, njena koncentracija i trajanje izloženosti ćelije;

- argumentacija za izbor koncentracija i broj kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti, ograničenju rastvorljivosti, ako su dostupni;

- sastav podloge, koncentracija CO2, ako je primenljivo;

- koncentracija ispitivane supstance;

- zapremina vehikuluma i dodate ispitivane supstance;

- temperatura inkubacije;

- vreme inkubacije;

- trajanje tretmana;

- gustina ćelija kod zasejavanja, ako je primenljivo;

- vrsta i sastav sistema metaboličke aktivacije, uključujući kriterijume prihvatljivosti;

- pozitivne i negativne kontrole;

- metode pripreme slajdova;

- kriterijumi za procenu aberacije;

- broj analiziranih metafaza;

- metode za merenje toksičnosti;

- kriterijumi za smatranje studija pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

4) Rezultatima:

- znakovi toksičnosti, tj. stepen konfluencije, podaci o ćelijskom ciklusu, broj izbrojanih ćelija, mitotski indeks;

- znakovi taloženja;

- podaci o pH i osmolalnosti podloge za tretiranje, ako je određeno;

- definicija za aberacije, uključujući oštećenja;

- broj ćelija sa hromozomskim aberacijama i vrsta aberacija hromozoma, za svaku tretiranu i kontrolnu kulturu posebno;

- promene u ploidiji, ako se vide;

- odnos doza - odgovor, kada je moguće;

- eventualne statističke analize;

- podaci o istovremenoj negativnoj (vehikulum) i pozitivnoj kontroli;

- podaci iz literature o negativnoj (vehikulum) i pozitivnoj kontroli sa opsezima, srednjim vrednostima i standardnim devijacijama.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Evans, H. J., (1976) Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, p. 1-29.

2. Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T., (1985). The *In vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, p. 427-432.

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

4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991) Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res, 257, p. 147-204.

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

6. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T., (1982) CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91-103.

16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L., (1983) Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, p. 795-801.

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

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

**B.11. MUTAGENOST - *IN VIVO* ISPITIVANJE HROMOZOMSKIH ABERACIJA NA KOSTNOJ SRŽI SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 475, Ispitivanje hromozomskih aberacija u kostnoj srži sisara (1997).

*1.1. UVOD*

Ispitivanje hromozomskih aberacija *in vivo* kod sisara koristi se za otkrivanje strukturnih hromozomskih aberacija koje je ispitivana supstanca izazvala u ćelijama kostne srži životinja, obično glodara**1, 2, 3, 4**. Strukturne hromozomske aberacije mogu biti dvojake: hromozomske i hromatidne. Povećanje poliploidnosti može da ukaže na to da hemikalija ima potencijal da izazove numeričke aberacije. Većina hemijskih mutagena izaziva aberacije hromatidnog tipa, ali dolazi i do aberacija hromozomskog tipa. Hromozomske mutacije i sa njima povezane pojave uzrok su mnogih genetskih bolesti kod ljudi i postoje značajni dokazi da su hromozomske mutacije i sa njima povezane pojave, koje izazivaju promene onkogena i tumor-supresorskih gena, povezane sa rakom kod ljudi i u eksperimentalnim sistemima.

U ovoj metodi ispitivanja obično se koriste glodari. Kostna srž predstavlja ciljno tkivo ovog ispitivanja, s obzirom da je reč o visoko prokrvljenom tkivu koje sadrži populaciju ćelija koje brzo prolaze kroz cikluse, a koje je moguće lako izolovati i obraditi. Druge životinjske vrste i ciljna tkiva nisu predmet ove metode ispitivanja.

Navedeno ispitivanje hromozomskih aberacija posebno je relevantno za procenu opasnosti od mutagenog dejstva jer omogućava da se uzme u obzir metabolizam *in vivo*, farmakokinetičke i procese reparacije DNK, iako se isti mogu razlikovati kod različitih vrsta i tkiva. *In vivo* ispitivanje korisno je i za dalje istraživanje mutagenih efekata otkrivenih prilikom *in vitro* ispitivanja.

Ovaj oblik ispitivanja ne odgovara ukoliko se pojave dokazi da ispitivana supstanca ili reaktivni metabolit neće dospeti do ciljnog tkiva.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Aberacija tipa hromatida jeste strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje između hromatida.

Aberacija tipa hromozoma jeste strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje hromatida na identičnom mestu.

Endoreduplikacija jeste proces kod koga nakon S faze replikacije DNK jedro ne ulazi u mitozu nego započinje druga S faza. Rezultat su hromozomi sa 4, 8, 16 i više hromatida.

"Gap" (prekid) jeste ahromatska lezija manja od širine jedne hromatide i sa minimalnom iskrivljenosti hromatida.

Numerička aberacija jeste promena u broju hromozoma u odnosu na normalan broj karakterističan za ćelije koje se koriste.

Poliploidija jeste pojava kada ćelija sadrži više od haploidnog broja hromozoma (n), osim kada sadrži diploidni broj (tj. 3n, 4n, itd).

Strukturna aberacija jeste promena u strukturi hromozoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom u metafazi ćelijske deobe, a koja se zapaža u vidu delecija i fragmentacija, translokacija ili inverzija.

*1.3. PRINCIP METODE*

Životinje se odgovarajućim putem izlažu ispitivanoj supstanci i lišavaju života na human način u određeno vreme nakon tretiranja. Pre lišavanja života na human način, životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemid®-om). Nakon toga, pripreme se preparati hromozoma ćelija kostne srži i analiziraju se ćelije u metafazi sa ciljem utvrđivanja hromozomskih aberacija.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Izbor životinjske vrste*

Obično se koriste pacovi, miševi i kineski hrčci. Mogu se koristiti i druge odgovarajuće vrste sisara. Koriste se mlade, zdrave, odrasle životinje sojeva koji se uobičajeno upotrebljavaju. Prilikom započinjanja istraživanja odstupanje u telesnoj masi životinja treba da bude minimalno i da ne prelazi ± 20% prosečne telesne mase za svaki pol.

*1.4.1.2. Uslovi smeštaja i ishrane*

Primenjuju se opšti uslovi koji su navedeni u Opštem uvodu, iako se nastoji da se vlažnost održi na nivou od 50% do 60%.

*1.4.1.3. Priprema životinja*

Zdrave odrasle životinje nasumično se grupišu u kontrolnu i tretirane grupe. Kavezi su takvi da mogući efekti na ispitivanje budu minimalni. Životinje se pojedinačno označavaju. Životinje se aklimatizuju na laboratorijske uslove najmanje pet dana pre početka ispitivanja.

*1.4.1.4. Priprema doza*

Pre tretiranja životinja ispitivanom supstancom čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju. Tečne ispitivane supstance mogu direktno da se primene ili da se razblaže pre primene. Sveži preparati ispitivane supstance se odmah upotrebljavaju, osim ukoliko podaci o stabilnosti ne pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Vehikulum*

Vehikulum ne sme da izaziva toksične efekte pri doznim nivoima koji se primenjuju i ne sme da postoji sumnja da će hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se primenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje se obrazlaže podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se primena vodenog rastvora.

*1.4.2.2. Kontrole*

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole se uključuju u svako ispitivanje i za svaki pol. Osim primene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama se postupa na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole proizvode strukturne aberacije *in vivo* pri nivoima izloženosti za koje se očekuje da će dati povećanje u odnosu na pozadinu koja može da se detektuje. Pozitivne kontrolne doze biraju se tako da efekti budu jasni, ali da licu koje očitava rezultate odmah ne otkriju identitet šifriranih mikroskopskih preparata (slajdova). Dozvoljeno je da se supstanca koja je pozitivna kontrola primeni putem koji je različit od puta primene ispitivane supstance, i da se uzorkuje samo jednom. Može se uzeti u obzir primena pozitivnih kontrola koje pripadaju istoj hemijskoj klasi kao i ispitivana hemikalija. Primeri supstanci koje se koriste kao pozitivne kontrole:

Tabela 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS br. | EINECS br. |
| etil metansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| etil nitrozourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| mitomicin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| ciklofosfamid ciklofosfamid monohidrat | 50-18-0 6055-19-2 | 200-015-4 |
| trietilenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Negativne kontrole, tretirane samo vehikulumom, sa kojima se inače postupa na isti način kao sa grupama obuhvaćenim tretmanom, su obuhvaćene svakim uzorkovanjem, osim ukoliko su dostupni podaci o varijabilnosti u okviru vrste i u frekvenciji ćelija sa hromozomskim aberacijama. Ukoliko se na negativne kontrole primenjuje jedno uzorkovanje, najprimerenije je vreme prvog uzorkovanja. Istovremeno se koriste i netretirane kontrole (kontrolni uzroci), osim ukoliko postoje podaci o kontrolama iz ranijih studija ili objavljeni kontrolni podaci koji dokazuju da odabran vehikulum ne izaziva štetne ili mutagene efekte.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Broj i pol životinja**

Svaka tretirana i kontrolna grupa obuhvata najmanje pet životinja istog pola na kojima je moguće obaviti analizu. Ukoliko postoje podaci istraživanja obavljenog na istoj vrsti i istim putem izlaganja koji dokazuju da ne postoje značajnije razlike u toksičnosti među polovima, dovoljno je obaviti ispitivanje kod samo jednog pola. U slučajevima u kojima izlaganje ljudi hemikalijama može da bude specifično za određeni pol, kao na primer kod nekih farmaceutskih agensa, ispitivanje se obavlja na životinjama odgovarajućeg pola.

**1.5.2. Plan tretmana**

Preporučuje se primena ispitivane supstance u okviru jednog tretmana. Ispitivane supstance je moguće davati u obliku podeljene doze, tj. dva tretmana tokom istog dana u razmaku od najviše nekoliko sati, kako bi se olakšalo davanje velike zapremine ispitivane supstance. Ostali režimi tretiranja naučno se opravdavaju.

Uzorci se uzimaju u dva navrata nakon tretmana tokom jednog dana. Kod glodara prvo vreme uzorkovanja je 1,5 dužina redovnog ćelijskog ciklusa (koji iznosi 12 do 18 sati) nakon tretmana. S obzirom da vreme koje je potrebno za unos i metabolizam ispitivane supstance, kao i za njen efekat na dinamiku ćelijskog ciklusa, može da utiče na optimalno vreme potrebno za otkrivanje hromozomske aberacije, preporučuje se i kasnije uzimanje uzorka: 24 sata nakon prvog uzorkovanja. Ukoliko se primenjuju režimi tretiranja ispitivanom supstancom duži od jednog dana, nakon poslednjeg tretmana obavlja se jedno uzorkovanje od oko 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa.

Pre lišavanja života na human način životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza agensa za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Životinjama se nakon toga uzimaju uzorci u odgovarajućim intervalima. Za miševe navedeni interval iznosi otprilike 3 do 5 sati, a za kineske hrčke interval je približno 4 do 5 sati. Ćelije se izoluju iz kostne srži i analiziraju radi otkrivanja hromozomskih aberacija.

**1.5.3. Dozni nivoi**

Ukoliko se ispitivanje obavlja sa ciljem utvrđivanja opsega doza zbog toga što nema dostupnih podataka, navedeno ispitivanje se obavlja u istoj laboratoriji, uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima tretiranja kao i u glavnom ispitivanju**5**. Ukoliko postoji toksičnost, za prvo uzorkovanje koriste se tri dozna nivoa. Navedene doze obuhvataju opseg od maksimalne do niske toksičnosti ili nivo bez toksičnosti. Prilikom narednog uzorkovanja potrebno je koristiti samo najvišu dozu. Najviša doza se definiše kao doza usled koje nastaju takvi znakovi toksičnosti da bi viša doza prouzrokovala uginjavanje životinja. Supstance specifične biološke aktivnosti u malim netoksičnim dozama (poput hormona i mitogena) mogu biti izuzetak za primenu kriterijuma za izbor doza i tada se doze procenjuju u zavisnosti od slučaja. Najviša doza se definiše i kao doza koja dovodi do nekih indikacija toksičnosti u kostnoj srži (npr. smanjenje mitotskog indeksa veće od 50%).

**1.5.4. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko u ispitivanju sa jednom dozom od najmanje 2.000 mg/kg TM u jednokratnom tretmanu ili u dva tretmana tokom istog dana ne nastanu nikakvi primetni toksični efekti i ukoliko se na osnovu podataka o strukturno srodnim supstancama ne očekuje genotoksičnost, nije potrebno primeniti kompletno ispitivanje primenom tri dozna nivoa. Za ispitivanja u trajanju do 14 dana granična doza iznosi 2.000 mg/kg TM/dan, a za tretmane koji traju duže od 14 dana 1.000 mg/kg TM/dan. Očekivana izloženost ljudi može da ukaže na potrebu za primenom više doze u ispitivanju granične doze.

**1.5.5. Primena doza**

Ispitivana supstanca obično se primenjuje intubacijom i to korišćenjem želudačne sonde ili odgovarajuće intubacione kanile ili intraperitonealnom injekcijom. Mogu se primeniti i drugi putevi izlaganja uz navođenje obrazloženja za tu primenu. Maksimalna zapremina tečnosti koju je moguće dati putem sonde ili injekcijom u jednom navratu zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne prelazi 2 mL/100 g TM. Upotrebu većih zapremina potrebno je obrazložiti. Izuzev u slučaju iritativnih i korozivnih supstanci kod kojih će se normalno ispoljiti pogoršani efekti pri višim koncentracijama, odstupanja u zapremini treba da budu minimalna podešavanjem koncentracije, kako bi se obezbedila konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

**1.5.6. Hromozomski preparat**

Odmah nakon što se životinja liši života na human način, uzima se kostna srž koja se izlaže hipotoničnom rastvoru i fiksira. Ćelije se nanesu na mikroskopske pločice i oboje.

**1.5.7. Analiza**

Kao mera citotoksičnosti određuje se mitotski indeks u najmanje 1.000 ćelija po životinji za sve tretirane životinje (uključujući pozitivne kontrole) i netretirane životinje negativne kontrolne grupe.

Analizi se podvrgava najmanje 100 ćelija svake životinje. Navedeni broj se može smanjiti ukoliko se uoči veliki broj aberacija. Sve preparate (slajdove), uključujući one pozitivne i negativne kontrole, potrebno je šifrovati pre mikroskopske analize. S obzirom da postupci izrade preparata često imaju za posledicu promenu proporcije metafaza uz gubitak hromozoma, ćelije koje se broje sadrže broj centromera jednak broju 2n ± 2.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci koji se odnose na pojedine životinje navode se tabelarno. Životinja predstavlja eksperimentalnu jedinicu. Za svaku životinju potrebno je odrediti broj ćelija koje se procenjuju, broj aberacija po ćeliji i procenat ćelija sa strukturnim hromozomskim aberacijama. Navode se različite vrste strukturnih hromozomskih aberacija zajedno sa svojim brojevima i frekvencijama, a u odnosu na tretirane i kontrolne grupe. Hromozomski prekidi navode se odvojeno, ali se generalno ne uključuju u ukupnu učestalost aberacija. Ukoliko ne postoje dokazi o razlikama među polovima, podatke dobijene ispitivanjem oba pola moguće je sjediniti radi statističke analize.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao što je dozno zavisno povećanje relativnog broja ćelija sa hromozomskim aberacijama ili jasno povećanje broja ćelija sa aberacijama u grupi koja je primila jednu dozu, prilikom jedinog vremena uzorkovanja. Prvenstveno se uzima u obzir biološki značaj rezultata. Statističke metode se mogu primeniti kao pomoćno sredstvo prilikom vrednovanja rezultata ispitivanja**6**. Statistički značaj ne treba da bude jedini faktor za utvrđivanje pozitivne reakcije. Dvosmisleni rezultati se pojašnjavaju daljim ispitivanjem, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova.

Povećanje poliploidnosti može da ukaže na to da ispitivana supstanca ima potencijal da izazove numeričke hromozomske aberacije. Povećanje endoreduplikacije (endomitoze) može da ukaže na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira progresiju ćelijskog ciklusa**7, 8**.

Ispitivana supstanca za koju dobijeni rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume, smatra se nemutagenom u ovom ispitivanju.

Iako većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima utvrđeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne odluke o delovanju ispitivane supstance. Rezultati mogu ostati dvosmisleni ili pod znakom pitanja, bez obzira na broj obavljenih eksperimenata.

Pozitivni rezultati ispitivanja hromozomskih aberacija *in vivo* ukazuju na to da supstanca uzrokuje hromozomske aberacije u kostnoj srži ispitivane životinjske vrste. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod navedenim eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva aberacije u kostnoj srži ispitivane vrste.

Potrebno je razmotriti verovatnoću da ispitivana supstanca ili njeni metaboliti dospeju u krvotok ili, konkretno, do ciljnog tkiva (npr. sistemska toksičnost).

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Vehikulumu:

- opravdanost izbora vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ukoliko su poznati.

2) Eksperimentalnim životinjama:

- vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor/poreklo, smeštaj, ishrana, itd.;

- pojedinačna telesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon telesne mase, srednju vrednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:

- pozitivna i negativna (vehikulum) kontrola;

- rezultati ispitivanja za utvrđivanje raspona doza, ukoliko je obavljeno;

- obrazloženje za izbor doznih nivoa;

- detalji pripreme ispitivane supstance;

- detalji primene ispitivane supstance;

- obrazloženje puta primene;

- metode za potvrdu činjenice da je ispitivana supstanca dospela u sistemski krvotok ili do ciljnog tkiva, ukoliko je primenljivo;

- način preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u dozu (mg/kg TM/dan), ukoliko je primenljivo;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- detaljan opis rasporeda tretmana i uzorkovanja;

- metode za merenje toksičnosti;

- identitet supstance koja zaustavlja metafazu, njena koncentracija i trajanje tretmana;

- metode pripremanja mikroskopskih preparata;

- kriterijumi za prebrojavanje aberacija;

- broj analiziranih ćelija po životinji;

- kriterijumi za proglašavanje ispitivanja pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

4) Rezultatima:

- znakovi toksičnosti;

- mitotski indeks;

- vrsta i broj aberacija, pojedinačno navedenih za svaku životinju;

- ukupan broj aberacija po grupi, srednja vrednost i standardna devijacija;

- broj ćelija sa aberacijama po grupi, srednja vrednost i standardna devijacija;

- promene u ploidiji, ukoliko su uočene;

- odnos doza - odgovor, gde je moguće;

- statističke analize, ukoliko postoje;

- podaci istovremene negativne kontrole;

- negativni kontrolni podaci iz literature sa opsezima, srednjim vrednostima i standardnim devijacijama;

- istovremeni pozitivni kontrolni podaci.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

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

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

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

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

5. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313-319.

6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. p. 184-232.

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

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

**B.12. MUTAGENOST - MIKRONUKLEUS TEST *IN VIVO* NA ERITROCITIMA SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 474, Mikronukleus test na eritrocitima sisara (1997).

*1.1. UVOD*

Mikronukleus test *in vivo* kod sisara koristi se za otkrivanje oštećenja izazvanih ispitivanom supstancom na hromozomima ili mitotskom sistemu eritroblasta, na osnovu analize eritrocita iz kostne srži i/ili ćelija periferne krvi životinja, obično glodara.

Svrha mikronukleus testa jeste identifikacija supstanci koje izazivaju citogenetska oštećenja koja za posledicu imaju formiranje mikronukleusa koji sadrži zaostale fragmente hromozoma ili čitave hromozome.

Kada se eritroblast kostne srži razvije u polihromatski eritrocit, glavni nukleus biva istisnut; svaki nastali mikronukleus može da zaostane u citoplazmi koja inače nema jezgro. Vidljivost mikronukleusa u ovim ćelijama olakšana je s obzirom da im nedostaje glavno jezgro. Povećanje učestalosti polihromatskih eritrocita sa mikronukleusima kod tretiranih životinja pokazatelj je izazvanih hromozomskih oštećenja.

Za navedeno ispitivanje obično se koristi kostna srž glodara, jer se proizvodnja polihromatskih eritrocita odvija u tom tkivu. Mera mikronukleusnih nezrelih (polihromatskih) eritrocita u perifernoj krvi jednako je prihvatljiva kod bilo koje vrste kod koje je dokazana nesposobnost slezine da ukloni mikronukleusne eritrocite ili koja je pokazala odgovarajuću osetljivost na otkrivanje agensa koji izazivaju strukturne ili numeričke hromozomske aberacije. Mikronukleuse je moguće razlikovati na osnovu većeg broja kriterijuma. Navedeni kriterijumi obuhvataju identifikaciju prisustva ili odsustva kinetohore ili centromere DNK u mikronukleusima. Učestalost mikronukleusnih nezrelih (polihromatskih) eritrocita predstavlja ciljni pokazatelj ispitivanja. U slučajevima kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, kao krajnja tačka ispitivanja može se koristiti broj zrelih (normohromatskih) eritrocita u perifernoj krvi koji sadrže mikronukleuse u datom broju zrelih eritrocita.

*In vivo* mikronukleus test kod sisara posebno je važan za procenu mutagenosti jer uzima u obzir faktore metabolizma *in vivo*, farmakokinetku i procese reparacije DNK, iako isti mogu da se razlikuju između različitih vrsta i tkiva, kao i između različitih genetskih pokazatelja ispitivanja. *In vivo* ispitivanje korisno je i za dalje istraživanje mutagenih efekata otkrivenih u *in vitro* sistemu.

Ovo ispitivanje ne odgovara ukoliko se pojave dokazi da ispitivana supstanca ili reaktivni metabolit neće stići do ciljnog tkiva.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Centromera (Kinetohora) jeste područje(a) hromozoma sa kojima su tokom ćelijske deobe povezane niti deobnog vretena, a čime je omogućeno uredno kretanje kćerki hromozoma prema polovima kćerki ćelija.

Mikronukleusi jesu zasebni mali nukleusi, odvojeni od glavnog jedra ćelije, nastali tokom telofaze mitoze (mejoze) zaostajanjem fragmenata hromozoma ili čitavih hromozoma.

Normohromatski eritrociti jesu zreli eritrociti kojima nedostaju ribozomi. Mogu se razlikovati od nezrelih polihromatskih eritrocita na osnovu crta karakterističnih za prisustvo ribozoma.

Polihromatski eritrociti jesu nezreli eritrociti u prelaznoj fazi razvoja koji još uvek sadrže ribozome. Mogu se razlikovati od zrelih, normohromatskih eritrocita na osnovu crta karakterističnih za prisustvo ribozoma.

*1.3. PRINCIP METODE*

Životinje se odgovarajućim putem izlažu ispitivanoj supstanci. Ukoliko se koristi kostna srž, životinje se lišavaju života na human način u odgovarajuće vreme nakon tretmana, nakon čega se uzima kostna srž i izrađuju i boje preparati**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**. Prilikom korišćenja periferne krvi, krv se uzima u odgovarajuće vreme nakon tretmana i izrađuju se preparati razmaza krvi koji se boje**4, 8, 9, 10**. Kod istraživanja sa perifernom krvlju vreme proteklo od poslednjeg izlaganja i ubiranja ćelija je što kraće. Preparati se analiziraju kako bi se utvrdilo postojanje mikronukleusa.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Izbor životinjske vrste*

U slučaju korišćenja kostne srži preporučuje se primena miševa i pacova, iako se mogu koristiti i druge odgovarajuće vrste sisara. U slučaju korišćenja periferne krvi preporučuju se miševi. Mogu se koristiti i druge odgovarajuće vrste sisara ako slezina te vrste ne uklanja eritrocite sa mikronukleusima ili da je vrsta pokazala odgovarajuću osetljivost za otkrivanje agensa koji izazivaju strukturne ili numeričke hromozomske aberacije. Koriste se mlade, zdrave životinje laboratorijskih sojeva koji se generalno upotrebljavaju. Prilikom započinjanja istraživanja odstupanje u telesnoj masi životinja treba da bude minimalno i ne veće od ± 20% prosečne telesne mase svakog pola.

*1.4.1.2. Uslovi čuvanja i ishrane*

Primenjuju se opšti uslovi dati u Opštem uvodu, iako se nastoji da se vlažnost održava na nivou od 50% do 60%.

*1.4.1.3. Priprema životinja*

Zdrave, odrasle životinje nasumično se grupišu u kontrolnu i tretirane grupe. Životinje se pojedinačno označavaju. Životinje se aklimatizuju na laboratorijske uslove najmanje pet dana. Kavezi su takvi da se mogući uticaji svedu na minimum.

*1.4.1.4. Priprema doza*

Pre primene, čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju. Tečne ispitivane supstance mogu direktno da se primene ili da se pre primene razblaže. Sveži preparati ispitivane supstance se odmah upotrebljavaju, osim ukoliko podaci o stabilnosti pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Vehikulum*

Vehikulum ne sme da izaziva toksične efekte pri doznim nivoima u kojima se primenjuje i ne sme da postoji sumnja da će hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se primenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje se obrazlaže podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se primena vodenog vehikuluma.

*1.4.2.2. Kontrole*

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole uključene su u svako ispitivanje i za svaki pol. Osim tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole treba da izazovu stvaranje mikronukleusa *in vivo* pri doznim nivoima za koje se očekuje da će dovesti do uočljivog povećanja u odnosu na negativnu kontrolu. Doze pozitivne kontrole biraju se tako da efekti budu jasni, ali da licu koja očitava rezultate odmah ne otkriju identitet šifriranih mikroskopskih preparata (slajdova). Dozvoljeno je da se pozitivna kontrola primeni putem koji je različit od puta primene ispitivane supstance, i uzorak se uzima samo jednom. Može se uzeti u obzir primena pozitivnih kontrola koje pripadaju istoj hemijskoj klasi kao i ispitivana hemikalija. Primeri supstanci koje se koriste kao pozitivne kontrole:

Tabela 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS br. | EINECS br |
| Etil metansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| N-etil-N-nitrozourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomicin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Ciklofosfamid Ciklofosfamid monohidrat | 50-18-0 6055-19-2 | 200-015-4 |
| Trietilenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Negativne kontrole, tretirane samo vehikulumom, sa kojima se postupa na isti način kao sa grupama obuhvaćenim tretmanom, obuhvaćene su svakim uzorkovanjem, osim ukoliko su dostupni podaci kontrole iz ranijih studija o varijabilnosti u okviru vrste i frekvenciji ćelija sa mikronukleusima. Ukoliko se na negativne kontrole primenjuje jedno uzorkovanje, najprimerenije je vreme prvog uzorkovanja. Istovremeno se koriste i netretirane kontrole (kontrolni uzroci), osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz prethodnih ispitivanja ili objavljeni kontrolni podaci koji dokazuju da odabran vehikulum ne izaziva štetne ili mutagene efekte.

Kada se koristi periferna krv može biti prihvatljiv i uzorak uzet pre tretmana u svojstvu negativne kontrole (negativnog kontrolnog uzorka), ali samo kod kratkotrajnih istraživanja periferne krvi (npr. 1 do 3 tretmana), a kada se dobijeni podaci nalaze unutar očekivanog opsega s obzirom na raniju kontrolu.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Broj i pol životinja**

Svaka tretirana i kontrolna grupa obuhvata najmanje pet životinja istog pola na kojima je moguće obaviti analizu**11**. Ukoliko postoje podaci istraživanja obavljenog na istoj vrsti i istim putem izlaganja koji dokazuju da ne postoje značajnije razlike među polovima u toksičnosti, dovoljno je da se ispitivanje obavi kod samo jednog pola. U slučajevima u kojima izlaganje ljudi hemikalijama može da bude specifično za pol, kao na primer kod nekih farmaceutskih agenasa, ispitivanje se obavlja sa životinjama odgovarajućeg pola.

**1.5.2. Plan tretmana**

Nije moguće preporučiti nikakav standardni plan tretmana (tj. jedan, dva ili više tretmana u intervalima od 24 sata). Uzorci dobijeni iz produženih režima tretmana prihvatljivi su ako je dokazan pozitivan efekat ili, kada je u pitanju negativno ispitivanje, ako je dokazana toksičnost ili upotrebljena granična doza i da je tretiranje nastavljeno sve do vremena uzorkovanja. Ispitivane supstance se mogu davati u obliku podeljenih doza, tj. u obliku dva tretmana tokom istog dana u razmaku od najviše nekoliko sati, kako bi se olakšalo davanje velike zapremine materijala.

Ispitivanje se može obaviti na dva načina:

a) Životinje se jednom tretiraju ispitivanom supstancom. Uzorci kostne srži uzimaju se najmanje dva puta, počevši najranije 24 sata nakon tretmana, ali najkasnije 48 sati nakon tretmana, uz primenu odgovarajućih intervala između uzimanja uzoraka. Uzorkovanje pre isteka perioda od 24 sata nakon tretmana potrebno je obrazložiti. Uzorci periferne krvi uzimaju se najmanje dva puta, počevši najranije 36 sati nakon tretmana, uz primenu odgovarajućih intervala nakon uzimanja prvog uzorka, ali ne duže od 72 sata nakon tretmana. Ukoliko se potvrdi pozitivna reakcija prilikom jednog intervala uzorkovanja, nije potrebno dalje uzorkovanje.

b) Ukoliko se primenjuje dva ili više tretmana dnevno (npr. dva ili više tretmana u intervalima od 24 sata), uzorci se uzimaju jednom, između 18 sati i 24 sata nakon konačnog tretmana kada je u pitanju kostna srž, i jednom između 36 sati i 48 sati nakon konačnog tretmana u slučaju periferne krvi**12**.

Mogu se dodatno primeniti drugi intervali uzorkovanja, kada je to značajno.

**1.5.3. Dozni nivoi**

Ukoliko se zbog nedostatka dostupnih podataka obavlja istraživanje sa ciljem utvrđivanja opsega doza, navedeno istraživanje se obavlja u istoj laboratoriji, uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima ispitivanja kao i u glavnom istraživanju**13**. Ukoliko postoji toksičnost, prilikom prvog uzorkovanja koriste se tri dozna nivoa. Navedene doze obuhvataju raspon od maksimalne do niske toksičnosti ili nivo bez toksičnosti. Prilikom drugog uzorkovanja potrebno je upotrebiti samo najvišu dozu. Najviša doza toksičnosti definiše se kao doza usled koje nastaju takvi znakovi toksičnosti da bi viša doza prouzrokovala uginjavanje životinja. Supstance specifične biološke aktivnosti u malim netoksičnim dozama (poput hormona i mitogena) mogu biti izuzetak od kriterijuma za izbor doza i tada se doze procenjuju u zavisnosti od slučaja. Najviša doza se može definisati i kao dozu koja dovodi do nekih indikacija toksičnosti u kostnoj srži (npr. smanjenje udela nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita u kostnoj srži ili perifernoj krvi).

**1.5.4. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko u ispitivanju sa jednom dozom od najmanje 2.000 mg/kg TM u jednokratnom tretmanu ili u obliku dva tretmana tokom istog dana ne nastanu nikakvi primetni toksični efekti i ukoliko se na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama ne očekuje genotoksičnost, nije potrebno primeniti kompletno ispitivanje primenom tri dozna nivoa. Za ispitivanja koja traju do 14 dana granična doza iznosi 2.000 mg/kg TM/dan, a za ispitivanja koja traju duže od 14 dana iznosi 1.000 mg/kg TM/dan. Očekivana izloženost ljudi može da ukaže na potrebu za primenom više doze u ispitivanju granične doze.

**1.5.5. Primena doza**

Ispitivana supstanca obično se primenjuje intubacijom, i to korišćenjem želučane sonde ili odgovarajuće intubacione kanile ili intraperitonealnom injekcijom. Mogu se primeniti i ostali putevi izlaganja uz obrazloženje. Maksimalna zapremina tečnosti koja se može dati putem sonde ili injekcijom u jednom navratu zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne prelazi 2 mL/100 g TM. Upotrebu većih zapremina potrebno je obrazložiti. Izuzev u slučaju iritanasa i koroziva kod kojih se efekti ispoljavaju pri višim koncentracijama, odstupanja u zapremini treba da budu minimalna podešavanjem koncentracije, a kako bi se obezbedila konstantna zapremina pri svim doznim nivoima.

**1.5.6. Pripremanje uzoraka koštane srži/krvi**

Ćelije kostne srži obično se dobijaju iz butne ili goleničnih kostiju odmah nakon lišavanja života na human način. Ćelije se izoluju iz butne kosti i golenice, pripremljene i obojene primenom potvrđenih metoda ispitivanja. Periferna krv se uzima iz repne vene ili drugog odgovarajućeg krvnog suda. Krvne ćelije se odmah supravitalno oboje**8, 9, 10** ili se izrade preparati u obliku razmaza koji se zatim oboje. Primenom boje koja je specifična za DNK (npr. akridin oranž**14** ili Hoechst 33258 plus pironin-Y**15**) mogu se otkloniti neki od nedostataka vezanih za primenu DNK-nespecifičnih boja. Navedena prednost ne isključuje primenu uobičajenih boja (npr. Giemsa). Mogu da se primene i dodatni sistemi (npr. celulozne ploče za otklanjanje nukleusnih ćelija**16**), ako je dokazano kako navedeni sistemi na odgovarajući način funkcionišu prilikom izrade mikronukleusnih preparata u laboratoriji.

**1.5.7. Analiza**

Udeo nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita (nezreli plus zreli) utvrđuje se za svaku životinju prebrojavanjem ukupnog broja od najmanje 200 eritrocita za kostnu srž i 1.000 eritrocita za perifernu krv**17**. Sve preparate, uključujući one pozitivne i negativne kontrole, potrebno je šifrirati pre mikroskopske analize. Za svaku životinju najmanje 2.000 nezrelih eritrocita podvrgava se analizi radi utvrđivanja pojave mikronukleusnih nezrelih eritrocita. Dodatni podaci mogu se dobiti prebrojavanjem zrelih eritrocita sa mikronukleusima. Prilikom analiziranja mikroskopskih preparata, udeo nezrelih eritrocita prema ukupnom broju eritrocita nije manji od 20% kontrolne vrednosti. Kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, na pojavu mikronukleusa može se ispitati najmanje 2.000 zrelih eritrocita po životinji. Sistemi za automatizovanu analizu (analiza krvne slike i protočna citometrija suspenzije ćelija) predstavljaju prihvatljive alternative manuelnom ocenjivanju ukoliko su opravdani i validirani.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci koji se odnose na pojedinačne životinje navode se tabelarno. Životinja predstavlja eksperimentalnu jedinicu. Za svaku analiziranu životinju zasebno se navodi: broj nezrelih vrednovanih eritrocita, broj mikronukleusnih nezrelih eritrocita i ukupan broj nezrelih eritrocita. Kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, potrebno je navesti i podatke o zrelim eritrocitima ukoliko se isti prikupljaju. Za svaku životinju se navodi odnos između broja nezrelih i ukupnog broja eritrocita i, ukoliko je potrebno, procenat mikronukleusnih eritrocita. Ukoliko ne postoje dokazi o razlikama među polovima, podaci dobijeni ispitivanjem oba pola mogu se sjediniti radi statističke analize.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao što je dozno zavisno povećanje broja mikronukleusnih ćelija ili jasno povećanje broja mikronukleusnih ćelija u grupi koja je primala jednu dozu, prilikom jednog intervala uzorkovanja. Prvenstveno se uzima u obzir biološka relevantnost rezultata. Mogu se primeniti statističke metode kao pomoćno sredstvo prilikom procene rezultata ispitivanja**18, 19**. Statistički značaj ne treba da bude jedini faktor za utvrđivanje pozitivne reakcije. Dvosmisleni rezultati se pojašnjavaju daljim ispitivanjem, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova.

Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume, u ovom ispitivanju smatra se nemutagenom.

Iako većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima utvrđeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne odluke o delovanju ispitivane supstance. Rezultati mogu ostati dvosmisleni ili pod znakom pitanja, bez obzira na broj obavljenih eksperimenata.

Pozitivni rezultati mikronukleus testa ukazuju na to da supstanca izaziva nastajanje mikronukleusa koji su posledica hromozomskih oštećenja ili oštećenja mitotskog sistema u eritroblastima eksperimentalne vrste životinja. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva nastanak mikronukleusa u nezrelim eritrocitima eksperimentalne vrste životinja.

Potrebno je razmotriti verovatnoću da ispitivana supstanca ili njeni metaboliti dospeju u krvotok ili, konkretno, do ciljnog tkiva (npr. sistemska toksičnost).

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Vehikulumu:

- opravdanost izbora vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ukoliko su poznati.

2) Eksperimentalnim životinjama:

- vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor, smeštaj, ishrana, itd.;

- pojedinačna telesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon telesne mase, srednju vrednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:

- pozitivna i negativna (vehikulum) kontrola;

- podaci ispitivanja za utvrđivanje raspona doza, ukoliko je obavljeno;

- obrazloženje za izbor doznih nivoa;

- detalji pripreme ispitivane supstance

- detalji primene ispitivane supstance;

- obrazloženje puta primene;

- metode za potvrdu činjenice da je ispitivana supstanca dospela u sistemski krvotok ili do ciljnog tkiva, ukoliko je primenljivo;

- način preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u dozu (mg/kg TM/dan), ukoliko je primenljivo;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- detaljan opis rasporeda tretmana i uzorkovanja;

- metode pripreme mikroskopskih pločica (slajdova);

- metode merenja toksičnosti;

- kriterijum za vrednovanje mikronukleusnih nezrelih eritrocita;

- broj analiziranih ćelija po životinji;

- kriterijum za smatranje ispitivanja kao pozitivnog, negativnog ili dvosmislenog.

4) Rezultatima:

- znakovi toksičnosti;

- udeo nezrelih eritrocita prema ukupnom broju eritrocita;

- broj mikronukleusnih nezrelih eritrocita, zasebno dat za svaku životinju;

- srednja vrednost ± standardna devijacija broja mikronukleusnih nezrelih eritrocita po grupama;

- odnos doza - odgovor, gde je moguće;

- primenjene statističke analize i metode;

- podaci negativne kontrole iz konkurentne studije i ranije studije;

- podaci pozitivne kontrolne iz konkurentne studije.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

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

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

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

4. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A., (1990) The *In vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, p. 29-80.

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

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

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

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

9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, (1992) Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., p. 278, 83-98.

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

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

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

13. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M., (1992) Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313-319.

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

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

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

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

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

19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K., (1989) Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 184-232.

**B. 13/14. MUTAGENOST: ISPITIVANJE REVERZNIH MUTACIJA NA BAKTERIJAMA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 471, Ispitivanje Bakterijskih Reverznih Mutacija (1997).

*1.1. UVOD*

Za ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija koriste se sojevi Salmonella-e typhimurium i Escherichia-e coli kojima su neophodne aminokiseline, sa ciljem otkrivanja tačkastih mutacija koje obuhvataju supstituciju, adiciju i deleciju jednog ili nekoliko parova baza DNK**1, 2, 3**. Princip ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija je da detektuje mutacije koje dovode do reverzije mutacija prisutnih u ispitivanim sojevima i tako obnavljaju funkcionalnu sposobnost bakterija da sintetišu esencijalne aminokiseline. Reverzno mutirane bakterije mogu se otkriti na osnovu njihove sposobnosti rasta u odsustvu aminokiseline koja je potrebna roditeljskom ispitivanom soju.

Tačkaste mutacije su uzrok mnogih genetskih oboljenja kod ljudi i postoje znatni dokazi da tačkaste mutacije u onkogenima i tumor-supresorskim genima somatskih ćelija učestvuju u nastanku tumora kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija je brzo, jeftino i relativno jednostavno za izvođenje. Mnogi eksperimentalni sojevi imaju nekoliko svojstava koje ih čine osetljivijim na otkrivanje mutacija, uključujući osetljive sekvence DNK na mestima reverzije, povećanu propustljivost ćelija za veće molekule i eliminaciju sistema reparacije DNK ili pojačavanja procesa reparacije DNK molekula sklonih greškama. Specifičnost eksperimentalnih sojeva može da pruži korisne podatke o tipu mutacija koje izazivaju genotoksični agensi. Dostupna je velika baza rezultata ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija za veliki broj različitih struktura i razvijene su dobro utemeljene metodologije za ispitivanje hemikalija sa različitim fizičkim i hemijskim svojstvima, uključujući isparljiva jedinjenja.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Ispitivanje reverzne mutacije na Salmonella typhimurium ili na Escherichia coli otkriva mutaciju u soju kome je neophodna aminokiselina (histidin odnosno triptofan, redom) koja proizvodi soj koji ne zavisi od spoljašnjeg izvora aminokiseline.

Mutageni koji dovode do supstitucije baznog para (mutageni supstitucije baznog para) jesu agensi koji izazivaju promene baza u DNK. U ispitivanju reverznih mutacija do ove promene može doći na mestu izvorne mutacije ili na drugom mestu u bakterijskom genomu.

Mutageni koji dovode do pomeranja okvira čitanja (mutageni pomaka okvira) jesu agensi koji izazivaju adiciju ili deleciju jednog ili više parova baza u DNK, menjajući time okvir očitavanja RNK.

*1.3. POLAZNA RAZMATRANJA*

Za ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija koriste se prokariotske ćelije koje se od ćelija sisara razlikuju u karakteristikama kao što su: unošenje, metabolizam, hromozomska struktura i procesi reparacije DNK. Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* obično zahtevaju upotrebu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Sistemi za *in vitro* metaboličku aktivaciju ne mogu potpuno da oponašaju *in vivo* uslove kod sisara. Ispitivanje ne pruža direktne podatke o mutagenom i karcinogenom potencijalu supstance kod sisara.

Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija obično se primenjuje kao inicijalni skrining za genotoksičnu aktivnost i, posebno, kao aktivnost koja izaziva pojavu tačkastih mutacija. Opsežna baza podataka pokazala je da mnoge hemikalije koje su u ovom ispitivanju dale pozitivan rezultat pokazuju mutageno delovanje i u drugim ispitivanjima. Postoje primeri mutagenih agensa koji se ne mogu otkriti ovim ispitivanjem. Razlozi za ove nedostatke mogu se pripisati specifičnoj prirodi efekta koji se detektuje, razlikama u metaboličkoj aktivaciji ili u bioraspoloživosti. Faktori koji povećavaju osetljivost ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija mogu da dovedu do precenjivanja mutagene aktivnosti.

Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija možda neće biti prikladno za procenu određenih klasa hemikalija, npr. visoko baktericidnih jedinjenja (npr. određeni antibiotici), kao i onih za koje se smatra (ili je poznato) da specifično interferiraju sa sistemom replikacije ćelija sisara (npr. neki inhibitori topoizomeraze i neki analozi nukleotida). U tim slučajevima mogu da budu primerenija ispitivanja mutacija na ćelijama sisara.

Iako je mnoštvo jedinjenja, koja daju pozitivan rezultat u ovom ispitivanju, karcinogeno za sisare, povezanost nije apsolutna. Ona zavisi od klase hemikalije, a postoje i karcinogeni koji se ne mogu otkriti ovim ispitivanjem zbog toga što deluju posredstvom drugih mehanizama koji nisu genotoksični ili putem mehanizama koji ne postoje u ćelijama bakterija.

*1.4. PRINCIP METODE*

Suspenzije bakterijskih ćelija izlažu se ispitivanoj supstanci u prisustvu i odsustvu egzogenog sistema metaboličke aktivacije. U okviru metode inkorporacije u podlogu, navedene suspenzije mešaju se sa nadslojem agara i odmah se nanose na minimalnu količinu podloge. U metodi preinkubacije smeša za tretman se inkubira, a zatim meša sa nadslojem agara pre nanošenja na minimalnu količinu podloge. Kod obe tehnike, nakon dva ili tri dana inkubacije, broje se revertantne kolonije i upoređuju sa brojem spontanih revertantnih kolonija na kontrolnim podlogama sa vehikulumom.

Opisano je nekoliko postupaka za izvođenje ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija. Među navedenim obično se koristi metoda inkorporacije u podlogu **1, 2, 3, 4**, metoda preinkubacije**2, 3, 5, 6, 7, 8**, metoda fluktuacije**9, 10** i metoda suspenzije**11**. Opisane su i modifikacije namenjene ispitivanju gasova ili para**12**.

Postupci opisani u metodi ispitivanja prvenstveno se odnose na metodu inkorporacije u podlogu i metodu preinkubacije. Obe metode prikladne su za izvođenje eksperimenta sa i bez metaboličke aktivacije. Neke supstance se mogu efikasnije otkriti primenom metode preinkubacije. Navedene supstance pripadaju hemijskim klasama koje uključuju alifatične nitrozamine kratkog lanca, dvovalentne metale, aldehide, azo-boje i diazo jedinjenja, pirolizidinske alkaloide, alil jedinjenja i nitro jedinjenja**3**. Određene klase mutagena ne mogu se uvek detektovati korišćenjem standardnih postupaka, poput metode inkorporacije u podlogu ili metode preinkubacije. Navedene klase mutagena smatraju se "posebnim slučajevima" i za njihovo otkrivanje preporučuje se korišćenje alternativnih postupaka. Mogu se identifikovati sledeći "posebni slučajevi" (zajedno s primerima postupaka koji se mogu upotrebiti za njihovo otkrivanje): azo-boje i diazo jedinjenja**3, 5, 6, 13**, gasovi i isparljive hemikalije**12, 14, 15, 16** i glikozidi**17, 18**. Odstupanje od standardnog postupka naučno se opravdava.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Pripreme**

*1.5.1.1. Bakterije*

Sveže kulture bakterija se uzgajaju do kasne eksponencijalne ili rane stacionarne faze rasta (približno 109 ćelija po mL). Kulture u kasnoj stacionarnoj fazi se ne upotrebljavaju. Potrebno je da kulture koje se koriste tokom eksperimenta sadrže visok titar vijabilnih bakterija. Titar se može pokazati ili iz krivih rasta na osnovu podataka kontrole iz ranijih studija ili u svakom ispitivanju utvrđivanjem broja vijabilnih ćelija eksperimentom na podlozi.

Preporučena temperatura inkubacije iznosi 37° C.

Potrebno je upotrebiti najmanje pet sojeva bakterija. Sojevi obuhvataju četiri soja S. typhimurium (TA1535; TA1537 ili TA97a ili TA97; TA98; i TA100) koji su se pokazali kao pouzdani i reproducibilni između laboratorija. Navedena četiri soja S. typhimurium imaju GC parove baza na primarnom mestu reverzne mutacije i poznato je da oni možda neće otkriti određene oksidujuće mutagene, agense koji dovode do unakrsnog povezivanja i hidrazine. Ovakve supstance mogu se otkriti pomoću sojeva E. coli WP2 ili S. typhimurium TA102**19** koji imaju AT bazni par na primarnom mestu reverzne mutacije. Preporučena kombinacija sojeva je:

- S. typhimurium TA1535 i

- S. typhimurium TA1537 ili TA97 ili TA97a i

- S. typhimurium TA98 i

- S. typhimurium TA100 i

- E. coli WP2 uvrA ili E. coli WP2 uvrA (pKM101) ili S. typhimurium TA102.

Kako bi se otkrili mutageni koji dovode do unakrsnog povezivanja, može biti potrebno da se uključi TA102 ili dodati soj E. coli koji je vičan u popravci DNK (npr. E. coli WP2 ili E. coli WP2 (PKM101)).

Potrebno je primeniti prihvaćene postupke za pripremanje "stock" kulture, verifikaciju markera i čuvanje. Potreba za aminokiselinama za rast demonstrira se za svaki preparat zamrznute "stock" kulture (za histidinom za sojeve S. typhimurium i triptofanom za sojeve E. coli). Na sličan način potrebno je proveriti ostale fenotipske karakteristike, odnosno prisustvo ili odsustvo plazmida R-faktora ako je potrebno (tj. rezistencija na ampicilin kod sojeva TA98, TA100 i TA97a ili TA97, WP2 uvrA i WP2 uvrA (pKM101) i rezistencija na ampicilin + tetraciklin kod soja TA102); postojanje svojstvenih mutacija (tj. rfa mutacija kod S. typhimurium putem osetljivosti na kristal-violet i uvrA mutacija kod E. Coli ili uvrB mutacija kod S. typhimurium, putem osetljivosti na ultraljubičastu svetlost)**2, 3**. Sojevi daju takav broj spontanih revertantnih kolonija na podlogama koji se nalazi u okviru raspona učestalosti koji se očekuje na osnovu podataka iz ranije kontrole laboratorije i koji se po mogućstvu nalazi unutar raspona koji se navodi u literaturi.

*1.5.1.2. Podloga*

Primenjuje se odgovarajući minimalni agar (npr. koji sadrži Vogel-Bonner-ovu minimalnu podlogu "E" i glukozu) i nadsloj agara koji sadrži histidin i biotin ili triptofan koji omogućava nekoliko deoba ćelija**1, 2, 9**.

*1.5.1.3. Metabolička aktivacija*

Bakterije se izlažu ispitivanoj supstanci i u prisustvu i u odsustvu sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom (S9) pripremljena od jetre glodara tretiranih agensima enzimske indukcije poput Aroclor-a 1254**1, 2** ili kombinacije fenobarbitona i ß-naftoflavona**18, 20, 21**. Postmitohondrijalna frakcija obično se koristi u koncentracijama u rasponu od 5% v/v do 30% v/v u obliku S9-mešavine. Izbor i uslovi sistema metaboličke aktivacije mogu da zavise od klase hemikalije koja se ispituje. U nekim slučajevima može da bude prikladno da se iskoristi više od jedne koncentracije postmitohondrijalne frakcije. Za azo-boje i diazo-jedinjenja može da se pokaže primerenijom primena sistema reduktivne metaboličke aktivacije**6, 13**.

*1.5.1.4. Ispitivana supstanca/Preparat*

Pre tretiranja bakterija, čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i, ukoliko je potrebno, da se razblaže. Tečne ispitivane supstance mogu se direktno dodati ispitivanim sistemima i/ili se razblažiti pre tretiranja. Sveži preparati ispitivane supstance upotrebljavaju se odmah, osim ukoliko podaci o stabilnosti pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

Ne sme da postoji sumnja da vehikulum hemijski reaguje sa ispitivanom supstancom. Vehikulum je kompatibilan sa preživljenjem bakterija i S9 aktivnošću**22**. Ukoliko se primenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje se potkrepljuje podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se vodeni vehikulum. Prilikom ispitivanja supstanci koje su nestabilne u vodi, organski rastvarači koji se koriste ne smeju sadržati vodu.

**1.5.2. Uslovi ispitivanja**

*1.5.2.1. Eksperimentalni sojevi*

Videti odeljak 1.5.1.1. ove metode.

*1.5.2.2. Koncentracija kojoj se izlažu bakterije*

Među kriterijima koji se uzimaju u obzir prilikom utvrđivanja najveće količine ispitivane supstance koja će se primeniti je citotoksičnost i rastvorljivost u konačnoj smeši namenjenoj za primenu.

Može da bude korisno da se utvrdi toksičnost i rastvorljivost u preliminarnom eksperimentu. Citotoksičnost se može otkriti preko redukcije broja revertantnih kolonija, bistrenjem ili smanjivanjem pozadine ili stepena preživljavanja tretiranih kultura. Citotoksičnost neke supstance može se promeniti usled prisustva sistema metaboličke aktivacije. Nerastvorljivost je potrebno oceniti kao precipitaciju (taloženje) u konačnoj mešavini pod stvarnim eksperimentalnim uslovima, a koja je vidljiva golim okom.

Preporučena maksimalna ispitivana koncentracija za rastvorne supstance koje nisu citotoksične iznosi 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga. Za supstance koje nisu citotoksične i koje se ne rastvaraju pri 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga, jedna ili više ispitivanih koncentracija treba da bude nerastvorna u konačnoj smeši namenjenoj za tretman. Ispitivane supstance koje su ciotoksične već pri nivoima nižim od 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga ispituju se sve do citotoksične koncentracije. Precipitat ne sme da utiče na ocenjivanje (prebrojavanje).

Potrebno je upotrebiti najmanje pet različitih koncentracija ispitivane supstance (koje je moguće analizirati) u intervalima od otprilike polovine log (tj. √10) između tačaka ispitivanja u inicijalnom eksperimentu. Manji intervali mogu se pokazati prikladnim prilikom ispitivanja veze između koncentracije i odgovora. Ispitivanje koncentracija iznad 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga može da se uzme u obzir prilikom vrednovanja supstance koje sadrže značajne količine potencijalno mutagenih nečistoća.

*1.5.2.3. Pozitivne i negativne kontrole*

Svako ispitivanje uključuje istovremene pozitivne i negativne kontrole (vehikuklum) specifične za soj, sa i bez metaboličke aktivacije. Potrebno je odabrati koncentracije pozitivne kontrole koje će pokazati efikasno obavljanje svakog eseja.

Za eseje sa sistemom metaboličke aktivacije, referentna supstanca pozitivne kontrole se bira na osnovu vrste bakterijskih sojeva koji se koriste.

Primeri supstanci odgovarajućih pozitivnih kontrola za eseje sa metaboličkom aktivacijom:

Tabela 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CAS br. | EINECS br. | Nazivi |
| 781-43-1 | 212-308-4 | 9,10-dimetilantracen |
| 57-97-6 | 200-359-5 | 7,12-dimetilbenzo[a]antracen |
| 50-32-8 | 200-028-5 | benzo[a]piren |
| 613-13-8 | 210-330-9 | 2-aminoantracen |
| 50-18-0 |  | ciklofosfamid |
| 6055-19-2 | 200-015-4 | ciklofosfamid monohidrat |

Supstanca koja predstavlja odgovarajuću pozitivnu kontrolu za metodu reduktivne metaboličke aktivacije:

Tabela 2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CAS br. | EINECS br | Nazivi |
| 573-58-0 | 209-358-4 | Kongo crveno |

2-aminoantracen se ne upotrebljava kao jedini indikator efikasnosti S9-smeše. Ukoliko se koristi 2-aminoantracen, svaki lot S9 takođe nosi obeležje mutagena koji zahteva metaboličku aktivaciju mikrozomalnim enzimima, npr. benz[a]piren, dimetilbenzantracen.

Supstance date u Tabeli 3 primeri su pozitivnih kontrola specifičnih za soj za eseje koji se sprovode bez egzogenog sistema metaboličke aktivacije:

Tabela 3.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| CAS br. | EINECS br. | Nazivi | Soj |
| 26628-22-8 | 247-852-1 | Natrijum-azid | TA 1535 i TA 100 |
| 607-57-8 | 210-138-5 | 2-nitrofluoren | TA 98 |
| 90-45-9 | 201-995-6 | 9-aminoakridin | TA 1537, TA 97 i TA 97a |
| 17070-45-0 | 241-129-4 | ICR 191 | TA 1537, TA 97 i TA 97a |
| 80-15-9 | 201-254-7 | Kumen hidroperoksid | TA 102 |
| 50-07-7 | 200-008-6 | mitomicin C | WP2 uvrA i TA102 |
| 70-25-7 | 200-730-1 | N-etil-N-nitro-N-nitrozogvanidin | WP2, WP2uvrA i WP2uvrA(pKM101) |
| 56-57-5 | 200-281-1 | 4-nitrohinolin-1-oksid | WP2, WP2uvrA i WP2uvrA (pKM101) |
| 3688-53-7 |  | Furilfuramid (AF2) | sojevi koji sadrže plazmid |

Mogu se koristiti i druge referentne supstance kao pozitivne kontrole. Uzima se u obzir upotreba hemikalije srodne klase kao pozitivna kontrola, kada je dostupna.

Potrebno je uključiti negativne kontrole koje se sastoje samo od vehikuluma, bez ispitivane supstance i sa kojima se postupa na isti način kao i sa tretiranim grupama. Potrebno je koristiti netretirane kontrole, osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz ranijih studija koji pokazuju da izabrani vehikulum ne dovodi do štetnih ili mutagenih efekata.

**1.5.3. Postupak**

Kod metode inkorporacije u podlogu**1, 2, 3, 4** bez metaboličke aktivacije, obično se 0,05 mL ili 0,1 mL ispitivanih rastvora, 0,1 mL sveže bakterijske kulture (koja sadrži otprilike 108 vijabilnih ćelija) i 0,5 mL sterilnog pufera pomeša sa 2,0 mL nadsloja agara. Za esej sa metaboličkom aktivacijom, obično se 0,5 mL smeše za metaboličku aktivaciju, koja sadrži odgovarajuću količinu postmitohondrijalne frakcije (u rasponu od 5% v/v do 30% v/v u smeši za metaboličku aktivaciju) meša s nadslojem agara (2,0 mL) zajedno s bakterijama i ispitivanom supstancom/ispitivanim rastvorom. Sadržaj svake epruvete izmeša se i prelije preko površine minimalne agar hranjive podloge. Nadsloj agara ostavlja se kako bi se stvrdnuo pre inkubacije.

Kod metode preinkubacije**2, 3, 5, 6** ispitivana supstanca/ispitivan rastvor se preinkubira zajedno s ispitivanim sojem (koji sadrži otprilike 108 vijabilnih ćelija) i sterilnim puferom ili sistemom metaboličke aktivacije (0,5 mL), obično u trajanju od 20 minuta ili duže, pri temperaturi od 30° C do 37° C, a pre mešanja s nadslojem agara i prelivanja preko površine minimalne agar podloge. Obično se 0,05 mL ili 0,1 mL ispitivane supstance/ispitivanog rastvora, 0,1 mL bakterija i 0,5 mL S9-smeše ili sterilnog pufera pomeša sa 2,0 mL nadsloja agara. Epruvete se tokom preinkubacionog perioda snabdevaju vazduhom, primenom uređaja za mućkanje.

Potrebno je da se primene po tri podloge za svaki dozni nivo u cilju odgovarajuće procene varijabilnosti. Prihvatljivo je da se primene po dve podloge u slučajevima kada je to naučno opravdano. Povremeni gubitak podloge ne čini nužno esej nevažećim.

Gasovite i isparljive supstance potrebno je ispitivati pomoću odgovarajućih metoda, npr. u zapečaćenim sudovima**12, 14, 15, 16**.

**1.5.4. Inkubacija**

Sve podloge u određenom ispitivanju se inkubiraju na temperaturi od 37 °C tokom 48 do 72 sata. Nakon perioda inkubacije prebrojava se broj revertantnih kolonija po podlozi.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci se navode u obliku broja revertantnih kolonija po podlozi. Navodi se broj revertantnih kolonija na podlogama negativne (kontrola sa vehikulumom i netretirana kontrola, ukoliko su primenjene) i pozitivne kontrole. Potrebno je navesti broj i srednju vrednost revetrantnih kolonija po podlozi i standardnu devijaciju za ispitivanu supstancu i pozitivne i negativne (netretirane i/ili vehikulum) kontrole.

Ne postoji potreba za verifikovanjem jasno pozitivne reakcije. Ako se dobiju dvosmisleni rezultati, razjašnjavaju se u daljim ispitivanjima, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova. Negativne rezultate potrebno je potvrditi u zavisnosti od slučaja. U slučajevima u kojima se potvrda negativnih rezultata ne smatra neophodnom, daje se obrazloženje. U narednim eksperimentima potrebno je razmotriti modifikaciju parametara ispitivanja s ciljem proširenja opsega ocenjivanih uslova. Parametri ispitivanja koje je moguće modifikovati obuhvataju razmak između koncentracija, metodu tretmana (inkorporacija u podlogu ili tečna preinkubacija) i uslove metaboličke aktivacije.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao što je povećanje u zavisnosti od koncentracije u okviru ispitivanog opsega i/ili reproducibilnog povećanja broja revertantnih kolonija po podlozi pri jednoj ili više koncentracija, kod najmanje jednog soja, sa ili bez sistema metaboličke aktivacije**23**. Prvenstveno se uzima u obzir biološki značaj rezultata. Mogu da se primene statističke metode kao pomoć prilikom ocenjivanja rezultata ispitivanja**24**. Statistički značaj ne treba da bude jedini činilac pomoću koga se utvrđuje pozitivni odgovor.

Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume smatra se nemutagenom u ovom ispitivanju.

Iako većina eksperimenata daje jasne pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima utvrđeni podaci ne omogućavaju donošenje konačnog suda o delovanju ispitivane supstance. Rezultati mogu da ostanu dvosmisleni ili pod znakom pitanja, bez obzira koliko se puta eksperiment ponovi.

Pozitivni rezultati ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija ukazuju na to da supstanca uzrokuje tačkaste mutacije supstitucijom baze ili pomeranjem okvira čitanja u genomu kod Salmonella typhimurium odnosno Escherichia coli. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva mutagene promene kod eksperimentne vrste.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Vehikulumu:

- obrazloženje izbora vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstanca u vehikulumu, ukoliko su poznati.

2) Sojevima:

- upotrebljeni sojevi;

- broj ćelija po kulturi;

- karakteristike soja.

3) Uslovima ispitivanja:

- količina ispitivane supstance po podlozi (mg/podloga ili µL/podloga) s obrazloženjem za izbor doze i broj podloga po koncentraciji;

- upotrebljena podloga;

- tip i sastav sistema metaboličke aktivacije, uključujući kriterijume prihvatljivosti;

- postupci tretmana.

4) Rezultatima:

- znakovi toksičnosti;

- znakovi precipitacije;

- broj za pojedinačne podloge;

- prosečan broj revertantnih kolonija po podlozi i standardna devijacija;

- odnos doza - odgovor, ako je moguće;

- statističke analize, ukoliko postoje;

- podaci negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole iz konkurentne studije, sa opsezima, srednjim vrednostima i standardnim devijacijama;

- podaci negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole iz ranije studije, sa opsezima srednjim vrednostima i standardnim devijacijama;

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

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

3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E., (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, p. 217-233.

4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V., (1986) The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, p. 69-240.

5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., (1975) Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, p. 91-96.

6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M., (1980) Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. p. 273-285.

7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R., (1980) Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press,p. 13-61.

8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L., (1987) Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, p. 167-177.

9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A., (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, p. 33-42.

10. Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984) The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. And Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, p. 141-161.

11. Thompson, E.D. and Melampy, P.J., (1981) An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. Environmental Mutagenesis, 3, p. 453-465.

12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994) Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, p. 335-344.

13. Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L., (1984) Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, p. 33-47.

14. Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K., (1992) Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, p. 2-141.

15. Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G., (1977) Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 249-258.

16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D., (1987) Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, p. 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T., (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium. Cancer Res., 39, p. 3780-3782.

18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N., (1980) Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p. 4961-4965.

19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G., (1990) Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, p. 285-291.

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "*In vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, p. 85-88.

21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175-177.

22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N., (1981) Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., p. 88343-350.

23. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E., (1987) Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, p. 83-91.

24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J., (1989) Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, p. 28-65.

**B.15. ISPITIVANJE MUTAGENOSTI I SKRINING ZA GENSKE MUTACIJE KARCINOGENOSTI-SACCAHAROMYCES CEREVISIAE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Merenje produkcije genskih mutacija izazvanih hemijskim agensima sa i bez metaboličke aktivacije može da se izvodi na više haploidnih i diploidnih sojeva kvasca Saccharomyces cerevisiae.

Koriste se rani sistemi mutacije kod haploidnih sojeva, poput merenja mutacije od crvenih mutanata zavisnih od adenina (*ade*-1, *ade*-2) do belih mutanata dvostruko zavisnih od adenina i selektivni sistemi poput indukcije rezistencije na kanavnain i cikloheksimid.

Najobimnije validiran sistem reverznih mutacija uključuje primenu haploidnog soja HV 185-14C koji nosi oker nonsense mutacije *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 i *trp* 5-48, koje su reverzibilne mutageninima supstitucije baza koji izazivaju mutacije specifičnih lokacija ili mutacije oker supresora. HV 185-14C takođe nosi marker *his* 1-7, missense mutaciju koja se reverzno mutira uglavnom kroz mutacije na drugoj lokaciji, kao i marker *hom* 3-10 koga reverzno mutiraju mutageni pomaka okvira čitanja.

U diploidnim sojevima S. cerevisiae jedini soj koji ima široku primenu je D7 koji je homozigotan za ilv 1-92.

*1.5. KRITERIJUMI KAVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Rastvori ispitivanih hemikalija i kontrola pripremaju se neposredno pre ispitivanja, uz primenu odgovarajućeg vehikuluma. Kada su u pitanju organska jedinjenja koja nisu rastvorna u vodi, ne upotrebljava se rastvor jači od 2% v/v za organske rastvarače kao što su etanol, aceton ili dimetilsulfoksid (DMSO). Konačna koncentracija vehikuluma ne treba u značajnoj meri da utiče na ćelijsku vijabilnost i svojstva rasta.

*1.6.1.1. Metabolička aktivacija*

Ćelije se izlažu ispitivanim hemikalijama i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg egzogenog sistema metaboličke aktivacije.

Najčešće korišćen sistem jeste postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom pripremljena od jetre glodara prethodno tretiranih agensima enzimske indukcije. Za metaboličku aktivaciju može biti prihvatljiva primena i drugih vrsta, tkiva, postmitohondrijalnih frakcija ili postupaka.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalni sojevi*

Haploidni soj HV 185-14C i diploidni soj D7 su sojevi koji se najčešće primenjuju u ispitivanjima genskih mutacija. Mogu da odgovaraju i drugi sojevi.

*1.6.2.2. Podloge*

Radi utvrđivanja preživljavanja i broja mutanata koriste se odgovarajuće podloge za kultivisanje.

*1.6.2.3. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

Potrebno je istovremeno izvesti pozitivne, netretirane i kontrole vehikuluma. Za svaki posmatrani specifični efekat mutacije primenjuju se odgovarajuće hemikalije pozitivne kontrole.

*1.6.2.4. Koncentracija izlaganja*

Potrebno je upotrebiti najmanje pet odgovarajuće raspoređenih koncentracija ispitivane supstance. Najviša ispitivana koncentracija toksičnih supstanci ne sme da smanji preživljenje ispod 5% do 10%. Supstance koje su relativno nerastvorne u vodi ispituju se do granice rastvorljivosti, uz primenu odgovarajućih postupaka. Za netoksične supstance koje se lako rastvaraju u vodi gornja granica koncentracije se određuje u zavisnosti od slučaja.

*1.6.2.5. Uslovi inkubacije*

Podloge se inkubiraju od četiri do sedam dana na temperaturi od 28° C do 30° C na tamnom mestu.

*1.6.2.6. Frekvencija spontanih mutacija*

Potrebno je da se koriste subkulture kod kojih je frekvenca spontanih mutacija u okviru prihvaćenog normalnog opsega.

*1.6.2.7. Broj replikata*

Neophodno je da se primene najmanje tri podloge po koncentraciji za esej prototrofa nastalih usled genske mutacije i za vijabilnost ćelija. U slučaju eksperimenta koji koriste markere kao što je hom 3-10 sa niskim stopom mutacija, broj hranljivih podloga se povećava kako bi se dobili statistički relevantni podaci.

**1.6.3. Postupak**

Tretiranje sojeva S. cerevisiae obično se obavlja u postupku ispitivanja u tečnoj podlozi koji obuhvata ćelije u fazi mirovanja ili ćelije u rastu. Inicijalni eksperimenti se izvode na ćelijama u rastu: 1-5 x 107 ćelija/mL izlaže se ispitivanoj hemikaliji do 18 sati na temperaturi od 28° C do 37° C uz mešanje. Tokom tretmana dodaje se odgovarajuća količina sistema metaboličke aktivacije kada je prikladno. Na kraju tretmana ćelije se centrifugiraju, ispiraju i zasejavaju na odgovarajuću podlogu. Nakon inkubacije, podloge se ocenjuju na preživljavanje i indukciju genskih mutacija.

Ukoliko je prvi eksperiment negativan, drugi eksperiment se izvodi uz primenu ćelija u fazi mirovanja. Ukoliko je prvi eksperiment pozitivan, potvrđuje se obavljanjem odgovarajućeg nezavisnog eksperimenta.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Navodi se: broj izbrojanih kolonija, broj mutanata, preživljavanje i učestalost mutacija. Sve rezultate potrebno je potvrditi u nezavisnom eksperimentu. Podaci se procenjuju primenom odgovarajućih statističkih metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- upotrebljenom soju;

- uslovima ispitivanja: faza mirovanja ili ćelije u rastu, sastav podloge, temperatura inkubacije i trajanje, sistem metaboličke aktivacije;

- uslovima tretiranja: nivoi izlaganja, postupak i trajanje tretmana, temperatura na kojoj se izvodi, pozitivne i negativne kontrole;

- broju izbrojanih kolonija, broj mutanata, preživljavanje i učestalost mutanata, odnos doza - odgovor, ukoliko je moguće, statističku procenu podataka;

- obrazloženju rezultata,

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.16. MITOTSKA REKOMBINACIJA - SACCAROMYCES CEREVISIAE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Mitotska rekombinacija kod Saccaromyces cerevisiae može se otkriti između gena (ili obično između gena i njegove centromere), kao i unutar gena. Prvi navedeni događaj naziva se mitotskim krosingoverom (crossing-over) i stvara recipročne proizvode, dok drugi događaj najčešće nije recipročan i naziva se konverzijom gena. Krosingover se obično ispituje na osnovu stvaranja recesivnih homozigotnih kolonija ili sektora stvorenih u heterozigotnom soju, dok se konverzija gena ispituje na osnovu stvaranja prototrofnih revertanata koji nastaju u auksotrofnom heteroalelnom soju koji nosi dva različita defektna alela istog gena. Najčešće korišćeni sojevi namenjeni otkrivanju mitotske konverzije gena su: D4 (heteroalel na *ade* 2 i trp 5), D7 (heteroalel na *trp* 5), BZ34 (heteroalel na *arg* 4) i JDl (heteroalel na *his* 4 i *trp* 5). Mitotski krosingover koji stvara crvene i ružičaste homozigotne sektore može da se analizira kod D5 ili D7 (čime se ujedno meri mitotska konverzija gena i reverzna mutacija na *ilv* 1-92), pri čemu su oba soja heteroalelna za komplementarne alele *ade* 2.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Rastvori ispitivanih hemikalija i kontrolnih ili referentnih jedinjenja pripremaju se neposredno pre ispitivanja, uz primenu odgovarajućeg vehikuluma. Kada su u pitanju organska jedinjenja koji nisu rastvorljiva u vodi, ne upotrebljava se rastvor jači od 2% v/v organskih rastvarača kao što su etanol, aceton ili dimetilsulfoksid (DMSO). Konačna koncentracija vehikuluma ne sme u značajnoj meri da utiče na ćelijsku vijabilnost i svojstva rasta ćelija.

*1.6.1.1. Metabolička aktivacija*

Ćelije se izlažu ispitivanim hemikalijama i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg egzogenog sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom, pripremljena od jetre glodara prethodno tretiranih agensima koji indukuju enzime. Za metaboličku aktivaciju mogu da se primene i druge vrste, tkiva, postmitohondrijalne frakcije ili postupci.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalni sojevi*

Najčešće se primenjuju sojevi diploidi D4, D5, D7 i JD1. Mogu da se koriste i drugi sojevi.

*1.6.2.2. Podloga*

Za određivanje preživljavanja i učestalosti mitotske rekombinacije koriste se odgovarajuće podloge.

*1.6.2.3. Upotreba pozitivnih i negativnih kontrola*

Istovremeno je potrebno izvoditi pozitivne, netretirane i kontrole vehikuluma. Primenjuju se odgovarajuće hemikalije pozitivne kontrole za svaki specifični pokazatelj ispitivanja rekombinacije.

*1.6.2.4. Koncentracije izlaganja*

Potrebno je upotrebiti najmanje pet odgovarajuće raspoređenih koncentracija ispitivane supstance. Među faktorima koji se uzimaju u obzir nalaze se citotoksičnost i rastvorljivost. Najniža koncentracija ne sme da ima efekat na vijabilnost ćelija. Najviša ispitivana koncentracija toksičnih hemikalija ne sme da smanji preživljenje ispod 5% do 10%. Hemikalije koje su relativno nerastvorne u vodi ispituju se do njihove granice rastvorljivosti uz primenu odgovarajućih postupaka. Za netoksične supstance koje se lako rastvaraju u vodi gornja granica koncentracije određuje se u zavisnosti od slučaja.

Ćelije mogu da se izlože ispitivanim hemikalijama u fazi mirovanja ili tokom rasta u trajanju do 18 sati. Za dugotrajne tretmane kulture se mikroskopski pregledaju na formiranje spora, čije postojanje čini ispitivanje nevažećim.

*1.6.2.5. Uslovi inkubacije*

Podloge se inkubiraju na tamnom mestu, od četiri do sedam dana, na temperaturi od 28° C do 30° C. Podloge koje se koriste za ispitivanje crvenih i ružičastih homozigotnih sektora koji su nastali mitotskim krosingoverom drže se u frižideru (na temperaturi oko 4° C) tokom jednog do dva dana pre ocenjivanja, a kako bi se omogućio razvoj odgovarajućih pigmentovanih kolonija.

*1.6.2.6. Učestalosti spontane mitotske rekombinacije*

Koriste se subkulture sa učestalošću spontanih mutacija mitotske rekombinacije u okviru prihvaćenog normalnog opsega.

*1.6.2.7. Broj replikata*

Za ispitivanje prototrofa nastalih usled mitotske konverzije gena i za vijabilnost ćelija neophodno je primeniti najmanje tri podloge po koncentraciji. U slučaju ispitivanja recesivnih homozigota koje nastaju mitotskim krosingoverom, potrebno je povećati broj podloga kako bi se obezbedio odgovarajući broj kolonija.

**1.6.3. Postupak**

Tretiranje sojeva S. Cerevisiae obično se obavlja postupkom u tečnoj podlozi koji uključuje ćelije u fazi mirovanja ili ćelije u rastu. Prethodni eksperimenti se obavljaju na ćelijama u rastu: 1-5 x 107 ćelija/mL izlaže se ispitivanoj hemikaliji do 18 sati na temperaturi od 28° C do 37° C uz mešanje. Tokom tretmana dodaje se odgovarajuća količina sistema za metaboličku aktivaciju, kada je prikladno.

Na kraju tretmana ćelije se centrifugiraju, ispiraju i zasejavaju na odgovarajuće podloge za kultivisanje. Nakon inkubacije, hranljive podloge se ocenjuju na preživljenje i indukciju mitotske rekombinacije.

Ukoliko je prvi eksperiment negativan, obavlja se drugi eksperiment uz primenu ćelija u fazi mirovanja. Ukoliko je prvi eksperiment pozitivan, ovaj rezultat se potvrđuje u nezavisnom eksperimentu.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Navodi se: broj izbrojanih kolonija, broj rekombinanata, preživljenje i frekvenca rekombinanata.

Potrebno je potvrditi rezultate u nezavisnom eksperimentu.

Podaci se procenjuju primenom odgovarajućih statističkih metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- upotrebljenom soju;

- uslovima ispitivanja: stacionarna faza ili ćelije u rastu, sastav podloge, temperatura inkubacije i trajanje, sistem metaboličke aktivacije;

- uslovima tretiranja: koncentracija kojoj su ćelije izložene, postupak i trajanje tretmana, temperatura, pozitivne i negativne kontrole;

- broju izbrojanih kolonija, broj rekombinanata, preživljenje i učestalost rekombinacije, odnos doza-odgovor, ukoliko je moguće, statistička procena podataka;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.17. MUTAGENOST - *IN VITRO* ISPITIVANJE GENSKE MUTACIJE NA ĆELIJAMA SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 476, *In vitro* ispitivanje genskih mutacija na ćelijama sisara (Mammalian Cell Gene Mutation Test) (1997).

*1.1. UVOD*

Za otkrivanje genskih mutacija izazvanih hemijskim supstancama može se koristiti ispitivanje genskih mutacija na ćelijama sisara *in vitro*. Odgovarajuće ćelijske linije obuhvataju L5178Y ćelije mišjeg limfoma, CHO, CHO-AS52 i V79 linije ćelija kineskog hrčka i TK6 ćelije humanog limfoblasta**1**. U ovim ćelijskim linijama najčešće posmatrani genski pokazatelji mere mutaciju na timidin kinazi (u daljem tekstu: TK) i hipoksantin-gvanin fosforibozil transferazi (u daljem tekstu: HPRT) i transgenu za ksantin-gvanin fosforibozil transferazu (u daljem tekstu: XPRT). Ispitivanja mutacija na TK, HPRT i XPRT otkrivaju različite spektre genetskih pojava. Autozomalna lokacija TK i XPRT može da omogući otkrivanje genetskih pojava (npr. velikih delecija), a koje nisu otkrivene na HPRT lokusu na X-hromozomima**2, 3, 4, 5, 6**.

*In vitro* ispitivanje genske mutacije na ćelijama sisara mogu da se izvode na kulturama definisanih ćelijskih linija ili ćelijskih sojeva. Ćelije koje se upotrebljavaju biraju se na osnovu sposobnosti rasta u kulturi i stabilnosti učestalosti spontanih mutacija.

Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* generalno zahtevaju primenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Ovaj sistem metaboličke aktivacije ne može u potpunosti da oponaša *in vivo* uslove kod sisara. Potrebno je da se izbegavaju uslovi koji dovode do rezultata koji ne oslikavaju intrinzičnu mutagenost. Usled promena pH, osmolalnosti ili visokih nivoa citotoksičnosti mogu da nastanu pozitivni rezultati koji ne oslikavaju intrinzičnu mutagenost**7**.

Navedeno ispitivanje koristi se za otkrivanje mogućih mutagena i karcinogena za sisare. Mnoga jedinjenja koja daju pozitivan rezultat u ovom ispitivanju karcinogeni su za sisare; međutim, međusobna zavisnost između ovog ispitivanja i karcinogenosti nije besprekorna. Korelacija zavisi od klase hemikalije i ima sve više dokaza da postoje karcinogeni koji se ne mogu otkriti ovim ispitivanjem zbog toga što deluju putem drugih, negenotoksičnih mehanizama ili mehanizama koji ne postoje u bakterijskim ćelijama**6**.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Napredna direktna mutacija jeste genska mutacija iz roditeljskog tipa u mutirani oblik koja dovodi do izmene ili gubitka enzimske aktivnosti ili funkcije kodiranog proteina.

Mutageni supstitucije baznog para jesu supstance koje dovode do supstitucije jednog ili nekoliko parova baza u DNK.

Mutageni pomaka okvira jesu supstance koje dovode do adicije ili delecije jednog ili više parova baza u molekulu DNK.

Vreme ekspresije fenotipa jeste vremenski period tokom koga nepromenjeni genski proizvodi bivaju odstranjeni iz novomutiranih ćelija.

Frekvenca mutanata jeste broj primećenih mutiranih ćelija podeljen brojem vijabilnih ćelija.

Relativni ukupni rast jeste povećanje broja ćelija tokom vremena u poređenju s kontrolnom populacijom ćelija. Izračunava se kao proizvod rasta u suspenziji u odnosu na vreme efikasnosti kloniranja negativne kontrole i u odnosu na negativnu kontrolu.

Relativni rast u suspenziji jeste povećanje broja ćelija tokom perioda ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu.

Vijabilnost jeste efikasnost kloniranja tretiranih ćelija u vreme zasejavanja u selektivnim uslovima nakon perioda ekspresije.

Preživljavanje jeste efikasnost kloniranja tretiranih ćelija nakon što se iste zaseju na podlogu na kraju perioda tretmana. Preživljavanje se obično izražava u odnosu na preživljenje kontrolne populacije ćelija.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ćelije bez timidin kinaze (u daljem tekstu: TK) su zbog mutacije TK+/- > TK-/- otporne na citotoksične efekte analoga pirimidina trifluorotimidina (u daljem tekstu: TFT). Ćelije s timidin kinazom osetljive su na TFT koji inhibira ćelijski metabolizam i zaustavlja dalju deobu ćelija. Zbog toga mutirane ćelije mogu da se razmnožavaju u prisustvu TFT-a, dok normalne ćelije, koje sadrže timidin kinazu, ne mogu. Slično se ćelije bez HPRT-a ili XPRT-a selektuju po otpornosti na 6-tiogvanin (u daljem tekstu: TG) ili 8-azagvanin (u daljem tekstu: AG). Svojstva ispitivane supstance pažljivo se razmatraju ukoliko se u bilo kojem ispitivanju genske mutacije u ćelijama sisara ispituje analog baze ili jedinjenje srodno selektivnom agensu. Na primer, potrebno je istražiti svaku selektivnu toksičnost na koju se sumnja da postoji kod ispitivane supstance, a u odnosu na mutirane i nemutirane ćelije. Potrebno je potvrditi efikasnost selekcijskog sistema/agensa, a kada se ispituju hemikalije koje su strukturno srodne selektivnom agensu**8**.

Ćelije u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi izlažu se ispitivanoj supstanci sa i bez metaboličke aktivacije, tokom odgovarajućeg vremenskog perioda i subkultivišu se kako bi se utvrdila citotoksičnost i kako bi se omogućila fenotipska ekspresija pre selekcije mutanata**9, 10, 11, 12, 13**. Citotoksičnost se obično utvrđuje merenjem relativne efikasnosti kloniranja (preživljenje) ili relativnog ukupnog rasta kultura nakon perioda tretiranja. Tretirane kulture održavaju se u podlozi za rast tokom dovoljnog vremenskog perioda, koje je karakteristično za svaki izabrani lokus i vrstu ćelija, a kako bi se omogućila skoro optimalna fenotipska ekspresija indukovanih mutacija. Frekvenca mutanata utvrđuje se zasejavanjem poznatog broja ćelija u podlozi koja sadrži selektivni agens, kako bi se detektovale mutirane ćelije, kao i u podlozi bez selektivnog agensa kako bi se utvrdila efikasnost kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg vremena inkubacije kolonije se prebroje. Frekvenca mutacija izračunava se iz broja mutiranih kolonija u selektivnoj podlozi i broja kolonija u neselektivnoj podlozi.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Ćelije*

Za primenu u ovom ispitivanju na raspolaganju je više vrsta ćelija, uključujući i suklonove ćelija L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ili TK6. Za vrstu ćelija koje se koriste u ovom ispitivanju treba da je dokazana osetljivost na hemijske mutagene, visoka efikasnost kloniranja i stabilna učestalost pojave spontanih mutanata. Potrebno je proveriti da ćelije nisu kontaminirane mikoplazmom i ukoliko su kontaminirane ne smeju se upotrebiti.

Ispitivanje je dizajnirano tako da ima unapred određenu osetljivost i potencijal. Broj upotrebljenih ćelija, kultura i koncentracija ispitivane supstance oslikava navedene definisane parametre**14**. Najmanji broj vijabilnih ćelija koje prežive tretman i broj onih koje se upotrebljavaju u svakoj fazi eksperimenta zasniva se na učestalosti spontanih mutacija. Preporuka je da se upotrebi onoliki broj ćelija koji je najmanje jednak deseterostrukoj recipročnoj vrednosti učestalosti spontanih mutacija. Preporučuje se primena najmanje 10**6** ćelija. Treba da su dostupni odgovarajući podaci o ćelijskom sistemu iz ranije studije kako bi ukazali na konzistentnost ispitivanja.

*1.4.1.2. Podloge i uslovi kultivisanja*

Upotrebljavaju se odgovarajuće podloge i uslovi inkubacije (posude za kulture, temperatura, koncentracija CO2 i vlažnost). Podloge se biraju u zavisnosti od selektivnog sistema i vrste ćelija koje se upotrebljavaju u ispitivanju. Posebno je važno izabrati uslove kultivisanja koji obezbeđuju optimalan rast ćelija tokom razdoblja ekspresije i sposobnost formiranja kolonija mutiranih i nemutiranih ćelija.

*1.4.1.3. Pripremanje kultura*

Ćelije se razmnože iz početnih kultura, zaseju na podlogu i inkubiraju na temperaturi od 37 °C. Pre upotrebe u ovom ispitivanju možda će iz kultura biti potrebno odstraniti već postojeće mutirane ćelije.

*1.4.1.4. Metabolička aktivacija*

Ćelije je potrebno izložiti ispitivanoj supstanci i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom (S9), pripremljena od jetre glodara tretiranih agensima koji indukuju enzime poput Aroclora 1254**15, 16, 17, 18** ili kombinacije fenobarbitona i ß-naftoflavona**19, 20**.

Postmitohondrijalna frakcija obično se koristi u koncentracijama u rasponu od 1% v/v do 10% v/v u konačnoj podlozi za ispitivanje. Izbor i stanje sistema metaboličke aktivacije mogu da zavisi od klase hemikalije koja se ispituje. U nekim slučajevima može biti prikladno da se koristi više od jedne koncentracije postmitohondrijalne frakcije.

Niz razvojnih promena, uključujući konstruisanje genetskim inžinjeringom ćelijskih linija sa ekspresijom specifičnih aktivišućih enzima, mogu da obezbede mogućnost za endogenu aktivaciju. Izbor upotrebljenih ćelijskih linija treba da bude naučno utemeljen (npr. na osnovu značaja izoenzima citohroma P450 za metabolizam ispitivane supstance).

*1.4.1.5. Ispitivana supstanca/Preparat*

Čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim rastvaračima ili vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju pre tretiranja ćelija. Tečne ispitivane supstance mogu direktno da se dodaju eksperimentnim sistemima odnosno da se razblaže pre tretiranja. Sveži preparati ispitivane supstance odmah se upotrebljavaju, osim ukoliko podaci o stabilnosti pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Behikulum*

Ne sme da postoji sumnja da će rastvarač/vehikulum hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Rastvarač/vehikulum je kompatibilan sa preživljenjem ćelija i aktivnošću S9. Ukoliko se primenjuju rastvarači/vehikulumi koja nisu poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje se potkrepljuje podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se da se prvo uzme u obzir primena vodenog rastvarača/vehikuluma. Prilikom ispitivanja supstance koje su nestabilne u vodi, organski rastvarači koji se koriste ne smeju da sadrže vodu. Voda se može odstraniti dodavanjem molekularnog sita.

*1.4.2.2. Koncentracije izlaganja*

Među kriterijumima koje je potrebno uzeti u obzir prilikom utvrđivanja najviše koncentracije su: citotoksičnost, rastvorljivost u ispitivanome sistemu i promene u pH i osmolalnosti.

Citotoksičnost je potrebno utvrditi sa i bez metaboličke aktivacije u glavnom eksperimentu uz primenu odgovarajućeg pokazatelja ćelijskog integriteta i rasta, kao što je relativna efikasnosti kloniranja (preživljavanje) ili relativni ukupni rast. Može da bude korisno da se odredi citotoksičnost i rastvorljivost u preliminarnom eksperimentu.

Upotrebljava se najmanje četiri koncentracije koje se mogu analizirati. Kada postoji citotoksičnost, navedene koncentracije obuhvataju raspon od maksimalne do niske ili bez toksičnosti. Ovo najčešće znači da razlika među nivoima koncentracija ne treba da bude veća od faktora između √2 i √10. Ukoliko se najviša koncentracija temelji na citotoksičnosti, tada za posledicu ima relativno preživljenje (relativnu efikasnost kloniranja) ili relativni ukupni rast od oko 10% do 20% (ali ne manje od 10%). Za relativno necitotoksične supstance najviša ispitivana koncentracija je 5 mg/mL 5 µL/mL, ili 0,01 M, u zavisnosti od toga koja koncentracija je niža.

Relativno nerastvorne supstance se ispituju do ili iznad njihove granice rastvorljivosti u uslovima kultivisanja. Dokaze nerastvorljivosti potrebno je utvrditi u konačnoj podlozi za tretiranje kome su izložene ćelije. Može da bude korisno da se rastvorljivost proceni na početku i na kraju tretmana, s obzirom da rastvorljivost može da se promeni tokom izlaganja u ispitivanom sistemu, usled prisutnosti ćelija, S9, seruma, itd. Nerastvorljivost se može otkriti golim okom. Precipitat ne sme da utiče na prebrojavanje.

*1.4.2.3. Kontrole*

U svaki eksperiment se uključuju istovremene pozitivne i negativne (rastvarač ili vehikulum) kontrole, sa i bez metaboličke aktivacije. Kada se koristi metabolička aktivacija, hemikalija pozitivne kontrole je ona kojoj je za mutageni odgovor potrebna aktivacija.

Primeri supstanci pozitivne kontrole:

Tabela 1.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Stanje  metaboličke  aktivacije | Lokus | Supstanca | CAS br. | EINECS br. |
| Nema egzogene metaboličke aktivacije | HPRT | etil metansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| etil nitrozourja | 759-73-9 | 212-072-2 |
| TK (male i velike kolonije) | metil  metansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| XPRT | etil metansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
|  | etil nitrozourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Postoji egzogena metabolička aktivacija | HPRT | 3-metilholantren | 56-49-5 | 200-276-4 |
| N-nitrozo-dimetilamin (dimetil-nitrozamin) | 62-75-9 | 200-549-8 |
| 7,12- dimetil  benzantracen | 57-97-6 | 200-359-5 |
| TK (male i velike kolonije) | ciklofosfamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| ciklofosfamid monohidrat | 6055-19-2 |  |
| benzo[a]piren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| 3-metilholantren | 56-49-5 | 200-276-5 |
| XPRT | N-nitrozodimetil amin (pri visokim koncentracijama S-9) | 62-75-9 | 200-549-8 |
| benzo[a]piren | 50-32-8 | 200-028-5 |

Mogu da se primene i druge odgovarajuće referentne supstance kao pozitivne kontrole, npr. ukoliko laboratorija raspolaže bazom podataka iz ranijih studija o 5-brom 2'-dezoksiuridinu (CAS br. 59-14-3, EINECS br. 200-415-9) tada mogu da se primene ove referentne supstance. Kada su dostupne klase hemikalija koje su vezi sa pozitivnom kontrolom, razmatra se njihovo korišćenje.

Potrebno je uključiti negativne kontrole koje se sastoje samo od rastvarača ili vehikuluma u podlozi za tretiranje i sa kojima je postupano na isti način kao i sa grupama obuhvaćenim tretmanom. Koriste se i netretirane kontrole, osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz prethodnih ispitivanja koji dokazuju da odabran rastvarač ne izaziva štetne ili mutagene efekte.

**1.4.3. Postupak**

*1.4.3.1. Tretiranje ispitivanom supstancom*

Ćelije u proliferaciji izlažu se ispitivanoj supstanci sa i bez metaboličke aktivacije. Trajanje izloženosti je odgovarajuće (obično se postiže efekat sa tri do šest sati). Vreme izlaganja može da se produži na jedan ili više ćelijskih ciklusa.

Pri ispitivanju svake koncentracije mogu da se tretiraju jedna ili dve kulture. Kada se upotrebljava jedna kultura, potrebno je povećati broj koncentracija kako bi se obezbedio odgovarajući broj kultura za analizu (npr. najmanje osam koncentracija koje se mogu analizirati). Potrebno je upotrebiti duplikat kulture negativne kontrole (rastvarača).

Gasovite ili isparljive supstance ispituju se primenom odgovarajućih metoda, npr. u zatvorenim posudama za kulture**21, 22**.

*1.4.3.2. Merenje preživljavanja, vijabilnosti i učestalosti mutacija*

Na kraju ekspozicije ćelije se ispiraju i kultivišu kako bi se odredio nivo preživljenja i kako bi se omogućila ekspresija mutiranog fenotipa. Merenje citotoksičnosti, na osnovu utvrđivanja relativne efikasnosti kloniranja (preživljenje) ili relativnog ukupnog rasta kultura, obično se počinje nakon tretmana.

Svakom lokusu je potrebno određeno minimalno vreme za skoro optimalnu ekspresiju fenotipa novoindukovanih mutacija (HPRT i XPRT zahtevaju najmanje 6-8 dana, dok su TK-u potrebna najmanje dva dana). Ćelije se uzgajaju u podlozi sa i bez selektivnih agenasa radi utvrđivanja broja mutanata i efikasnosti kloniranja, redom. Merenje vijabilnosti (koja se koristi za izračunavanje učestalosti mutacija) započinje na kraju vremena ekspresije zasejavanjem u neselektivnu podlogu.

Ukoliko ispitivana supstanca prilikom ispitivanja L5178Y TK+/- da pozitivan rezultat, kolonije se razvrstavaju po veličini (izmeriti veličinu) kod najmanje jedne od ispitivanih kultura (najviša pozitivna koncentracija) i kod negativnih i pozitivnih kontrola. Ukoliko ispitivana supstanca prilikom ispitivanja L5178Y TK+/- da negativan rezultat, kolonije je potrebno razvrstati po veličini kod negativnih i pozitivnih kontrola. Razvrstavanje kolonija po veličini može da se obavi i kod ispitivanja u kojima se primenjuje TK6TK+/-.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci obuhvataju citotoksičnost i vijabilnost, broj kolonija i učestalost mutacija za tretirane i kontrolne kulture. U slučaju pozitivne reakcije u eksperimentu L5178Y TK+/-, kolonije se prebrojavaju prema kriterijumu velikih i malih kolonija kod najmanje jedne koncentracije ispitivane supstance (najviše pozitivne koncentracije) i kod negativne i pozitivne kontrole. Molekularna i citogenetska priroda velikih i malih kolonija mutanata detaljno je istražena**23, 24**. U eksperimentu TK+/-, kolonije se prebrojavaju prema kriterijumu kolonija normalnog rasta (velike) i kolonija usporenog rasta (male)**25**. Mutirane ćelije koje su pretrpele najopsežnija genetska oštećenja imaju produženo vreme udvostručavanja i zbog toga formiraju male kolonije. Opseg navedenih oštećenja obično se kreće od gubitka čitavog gena do hromozomskih aberacija koje su vidljive u kariotipu. Indukcija mutanata s malim kolonijama dovodi se u vezu sa hemikalijama koje uzrokuju velike hromozomske aberacije**26**. Mutirane ćelije koje su manje pogođene rastu brzinom koja je slična roditeljskim ćelijama i formiraju velike kolonije.

Navodi se i preživljavanje (relativne efikasnosti kloniranja) ili relativni ukupni rast. Učestalost mutacija se izražava u obliku broja mutiranih ćelija u odnosu na broj preživelih ćelija.

Tabelarno se navode podaci o pojedinačnim kulturama.

Ne postoji potreba za verifikovanjem jasno pozitivne reakcije. Dvosmisleni rezultati se pojašnjavaju daljim ispitivanjem, tj. najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova. Negativne rezultate potrebno je potvrditi u zavisnosti od slučaja. U slučajevima u kojima se potvrda negativnih rezultata ne smatra neophodnom, potrebno je navesti obrazloženje. Za dvosmislene ili negativne rezultate kod daljih eksperimenata koji se nadovezuju na prethodne potrebno je razmotriti modifikaciju parametara ispitivanja s ciljem proširenja opsega vrednovanih uslova. Parametri ispitivanja koje je moguće modifikovati obuhvataju razmak izeđu koncentracija i uslove metaboličke aktivacije.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao što je povećanje učestalosti mutacija u zavisnosti od koncentracije ili reproducibilno. Prvenstveno je potrebno uzeti u obzir biološki značaj rezultata. Mogu da se primene statističke metode kao pomoć prilikom vrednovanja rezultata ispitivanja. Statistički značaj ne treba da bude jedini kriterijum za pozitivnu reakciju.

Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume smatra se nemutagenom u ovom ispitivanju. Iako većina eksperimenta daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima utvrđeni podaci onemogućavaju donošenje konačne odluke o delovanju ispitivane supstance. Rezultati mogu da ostanu dvosmisleni ili pod znakom pitanja, bez obzira koliko se puta eksperiment ponovi.

Pozitivni rezultati *in vitro* ispitivanja genskih mutacija u ćelijama sisara ukazuju na to da ispitivana supstanca uzrokuje genske mutacije u upotrebljenim kultivisanim ćelijama sisara. Od najvećeg značaja je postojanje reproducibilnog pozitivnog odgovora zavisnog od koncentracije. Negativni rezultati pokazuju da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne uzrokuje genske mutacije u upotrebljenim kultivisanim ćelijama sisara.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Rastvaraču/vehikulumu:

- obrazloženje izbora rastvarača/vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u rastvaraču/vehikulumu, ukoliko su poznati.

2) Ćelijama:

- vrsta i poreklo ćelija;

- broj ćelijskih kultura;

- broj prolaza ćelija, ukoliko je primenljivo;

- metode za održavanje ćelijske kulture, ukoliko je primenljivo;

- odsustvo mikoplazme.

3) Uslovima ispitivanja:

- logička osnova za izbor koncentracija i broj kultura, uključujući, podatke o citotoksičnosti i ograničenja zbog rastvorljivosti, ukoliko postoje;

- sastav podloge, koncentracija CO2;

- koncentracija ispitivane supstance;

- zapremina vehikuluma i dodate ispitivane supstance;

- temperatura inkubacije;

- vreme inkubacije;

- trajanje tretmana;

- gustina ćelija tokom tretmana;

- tip i sastav sistema metaboličke aktivacije, uključujući kriterijume prihvatljivosti;

- pozitivne i negativne kontrole;

- dužina perioda ekspresije (uključujući broj zasejanih ćelija i supkultura i raspored prehranjivanja, ukoliko odgovara);

- selektivni agensi;

- kriterijum za smatranje ispitivanja pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim;

- metode primenjene za prebrojavanje vijabilnih ćelija i mutiranih ćelija;

- definicija kolonija čija se veličina i vrsta uzimaju u obzir (uključujući kriterijume za "male" i "velike" kolonije, ako odgovara).

4) Rezultatima:

- znakovi toksičnosti;

- znakovi precipitacije;

- podaci o pH i osmolalnosti tokom izlaganja ispitivanoj supstanci, ukoliko su utvrđeni;

- veličina kolonija ukoliko je ista utvrđena barem za negativne i pozitivne kontrole;

- adekvatnost laboratorije da otkrije mutante malih kolonija primenom sistema L5178Y TK+/-, kada je potrebno;

- odnos doza - odgovor, gde je moguće;

- statističke analize, ukoliko postoje;

- podaci negativne (rastvarač/vehikulum) i pozitivne kontrole iz konkurentne studije;

- podaci negativne (rastvarač/vehikulum) i pozitivne kontrole iz ranije studije, sa opsezima, srednjom vrednosti i standardnom devijacijom;

- učestalost mutanata.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, CoLD Spring Harbor Laboratory, New York.

2. Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

3. Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.

4. Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and DearfieLD, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394-403.

5. Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

6. Aaron, C.S., BolcsfoLDi, G.,Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. And Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicfity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

8. Clive, D., McCuen, R., Spestor, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.

9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

10. Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O’Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

11. Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- -TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenisity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

16. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61-108.

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

19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

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

21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51-55.

24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161-174.

25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, 89-102.

26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609-614.

**B.18. OŠTEĆENJE I REPARACIJA DNK - VANREDNA SINTEZA DNK - ĆELIJE SISARA IN VITRO**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivanje vanredne sinteze DNK (u daljem tekstu: UDS) meri sintezu DNK za reparaciju nakon isecanja i otklanjanja odsečka DNK koji sadrži region oštećenja koji je izazvan hemijskim i fizičkim agensima. Ispitivanje se zasniva na ugrađivanju timidina obeleženog tricijumom (u daljem tekstu: 3H-TdR) u DNK ćelije sisara koje se ne nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa. Aktivno preuzimanje 3H-TdR može da se odredi autoradiografijom ili tečnim scintilacionim brojanjem (u daljem tekstu: LSC) DNK iz tretiranih ćelija. Ćelije sisara u kulturi, osim ukoliko se ne koriste primarni hepatociti pacova, tretiraju se ispitivanim agensom sa i bez egzogenog sistema metaboličke aktivacije. UDS može da se meri i u *in vivo* sistemima.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Preparati**

Ispitivane hemikalije i kontrolne ili referentne supstance pripremaju se u podlozi za rast ili se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i zatim se dodatno razblažuju u podlozi za rast za upotrebu u eksperimentu. Konačna koncentracija vehikuluma ne sme da utiče na vijabilitet ćelija.

U eseju mogu da se koriste primarne kulture hepatocita pacova, ljudskih limfocita ili utvrđenih ćelijskih linija (npr. ljudski diploidni fibroblasti).

Ćelije se izlažu ispitivanoj hemikaliji i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Broj kultura*

Potrebno je najmanje dve kulture ćelija za autoradiografiju i šest kultura (ili manje ukoliko je to naučno opravdano) za određivanje LSC UDS za svaku eksperimentalnu tačku.

*1.6.2.2. Upotreba negativnih i pozitivnih kontrola*

U svako ispitivanje se uključuju istovremene pozitivne i negativne (netretirane i/ili vehikulum) kontrole, sa i bez metaboličke aktivacije.

Primeri pozitivnih kontrola za eksperiment sa hepatocitima pacova obuhvataju 7,12-dimetil benzantracen (7,12-DMBA) ili 2-acetil aminofluoren (2-AAF). U slučaju utvrđenih ćelijskih linija, 4-nitrokvinolin-N-oksid (4-NQO) predstavlja primer pozitivne kontrole i za autoradiografske i za LSC eseje koji se izvode bez metaboličke aktivacije. N-dimetil nitrozamin je primer jedinjenja pozitivne kontrole kada se koriste sistemi metaboličke aktivacije.

*1.6.2.3. Koncentracije izlaganja*

Primenjuju se višestruke koncentracije ispitivane supstance u rasponu koji odgovara za definisanje odgovora. Najviša koncentracija izaziva određene citotoksične efekte. Jedinjenja koji su relativno nerastvorna u vodi ispituju se do granice rastvorljivosti. U slučaju hemikalija koje su netoksične i dobro rastvorne u vodi, gornja ispitivana koncentracija hemikalije utvrđuje se u zavisnosti od slučaja.

*1.6.2.4. Ćelije*

Prilikom održavanja kultura potrebno je primeniti odgovarajući podlogu za rast, koncentraciju CO2, temperaturu i vlažnost. Utvrđene ćelijske linije periodično se proveravaju na kontaminaciju mikoplazmom.

*1.6.2.5. Metabolička aktivacija*

Sistem metaboličke aktivacije ne koristi se sa primarnim kulturama hepatocita. Određene ćelijske linije i limfociti izlažu se ispitivanoj supstanci i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije.

**1.6.3. Postupak**

*1.6.3.1. Priprema kultura*

Utvrđene ćelijske linije dobijaju se iz "stock", kultura (npr. tripsinizacijom ili otresanjem), zasađuju se u posude za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini i inkubiraju na temperaturi od 37° C.

Kratkotrajne kulture hepatocita pacova utvrđuju se omogućavanjem sveže izdvojenim hepatocitima da se u odgovarajućoj podlozi pričvrste za površinu za rast.

Kulture ljudskih limfocita uspostavljaju se korišćenjem odgovarajućih metoda.

*1.6.3.2. Tretiranje kultura ispitivanom supstancom*

1.6.3.2.1. Primarni hepatociti pacova

Sveže izolovani hepatociti pacova tretiraju se ispitivanom supstancom u podlozi koja sadrži 3H-TdR tokom odgovarajućeg vremenskog perioda. Na kraju perioda tretiranja, podloga se odstranjuje sa ćelija, koje se nakon toga ispiraju, fiksiraju i suše. Slajdovi se zatim umoče u autoradiografsku emulziju (može se koristiti alternativni tanki film), izlože, razviju, oboje i prebroje.

1.6.3.2.2. Utvrđene ćelijske linije i limfociti

Autoradiografske tehnike: ćelijske kulture se izlažu ispitivanoj supstanci tokom odgovarajućih vremenskih perioda, nakon čega se tretiraju sa 3H-TdR. Vremenski periodi se određuju u skladu sa prirodom supstance, aktivnosti metaboličkih sistema i vrstom ćelija. Kako bi se otkrio maksimum UDS-a, potrebno je dodati 3H-TdR, istovremeno s ispitivanom supstancom ili tokom nekoliko minuta nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Na izbor jednog od ova dva postupka utiču moguće interakcije ispitivane supstance i 3H-TdR. Kako bi se napravila razlika između UDS i semi-konzervativne replikacije DNK, ova druga se može sprečiti, npr. primenom podloge bez arginina, niskog sadržaja seruma ili hidroksiureom u podlozi za kultivisanje.

LSC merenja UDS-a: pre tretiranja ispitivanom supstancom potrebno je blokirati ulazak ćelija u S-fazu na način kako je gore opisano. Ćelije se zatim izlažu ispitivanoj hemikaliji na način kako je opisano za autoradiografiju. Na kraju perioda inkubacije, DNK se ekstrahuje iz ćelija i određuje se ukupni sadržaj DNK i stepen inkorporacije 3H-TdR.

U slučajevima kada se koriste ljudski limfociti u gore navedenim tehnikama, kod nestimulisanih kultura nije potrebna supresija semi-konzervativne replikacije DNK.

*1.6.3.3. Analize*

1.6.3.3.1. Autoradiografska određivanja

Prilikom određivanja UDS-a u ćelijama u kulturi ne prebrojavaju se jedra u S-fazi. Potrebno je prebrojati najmanje 50 ćelija po koncentraciji. Slajdovi se pre prebrojavanja šifruju. Na svakom slajdu se prebroji nekoliko široko razdvojenih nasumičnih polja. Količina inkorporacije 3H-TdR u citoplazmi određuje se prebrojavanjem tri područja veličine nukleusa u citoplazmi svake prebrojane ćelije.

1.6.3.3.2. LSC određivanja

Za LSC UDS određivanja, za svaku koncentraciju, primenjuje se odgovarajući broj kultura, kao i za kontrolu.

Svi rezultati se potvrđuju u nezavisnom eksperimentu.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno.

*2.1. AUTORADIOGRAFSKA ODREĐIVANJA*

Stepen inkorporacije 3H-TdR u citoplazmi i broj zrna pronađenih u jedru ćelije odvojeno se navode.

Za opisivanje raspodele stepena inkorporacije 3H-TdR u citoplazmi i broja zrna po nukleusu mogu da se koriste srednje vrednosti, medijana i modus.

*2.2. LSC ODREĐIVANJA*

Za određivanja koja se odnose na LSC, inkorporaciju 3H-TdR potrebno je izraziti kao dpm/μg DNK. Može se primeniti srednja vrednost dpm/μg DNK sa standardnom devijacijom, a kako bi se opisala raspodela inkorporacije. Podaci se procenjuju odgovarajućim statističkim metodama.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- upotrebljenim ćelijama, gustini i broju prolaza u vreme tretiranja, broju kultura ćelija;

- metodi primenjenoj u održavanju ćelijskih kultura, uključujući podlogu, temperaturu i koncentraciju CO2;

- ispitivanoj supstanci, vehikulumu, koncentraciji i logičkoj osnovi za izbor koncentracija primenjenih u ispitivanju;

- detaljima o sistemima metaboličke aktivacije;

- rasporedu tretmana;

- pozitivnim i negativnim kontrolama;

- primenjenoj autoradiografskoj tehnici;

- postupcima korišćenim za blokiranje ulaska ćelija u S-fazu;

- postupcima korišćenim za ekstrakciju DNK i utvrđivanje ukupnog sadržaja DNK u LSC određivanju;

- odnosu doza/odgovor, kada je moguće;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.19. *IN VITRO* ISPITIVANJE IZMENE SESTRINSKIH HROMATIDA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivanje izmene sestrinskih hromatida (u daljem tekstu: SCE) jeste kratkotrajno ispitivanje namenjeno otkrivanju međusobnih izmena DNK dve sestrinske hromatide hromozoma koji se udvostručava. SCE predstavlja izmenu proizvoda replikacije DNK na naizgled homologim mestima. Postupak razmene verovatno obuhvata prekidanje i ponovno sjedinjavanje DNK, iako se malo zna o njegovoj molekulskoj osnovi. Detekcija SCE-a zahteva ulaganje određenog napora u diferencijalno obeležavanje sestrinskih hromatida, što se može postići inkorporacijom bromdeoksiuridina (u daljem tekstu: BrdU) u hromozomsku DNK kroz dva ćelijska ciklusa.

Ćelije sisara *in vitro* izlažu se ispitivanoj hemikaliji sa i bez sisarskog egzogenog sistema metaboličke aktivacije, ukoliko je svrsishodno i kultivišu se tokom dva kruga replikacije u medijumu koji sadrži BrdU. Posle obrade inhibitorom deobnog vretena (npr. kolhicinom) da bi se akumulirale ćelije u stadijumu mitoze koji je sličan metafazi (c-metafaza) ćelije se skupljaju i pripremaju se hromozomski preparati.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Preparati**

U ispitivanju mogu da se koriste primarne kulture (ljudski limfociti) ili određene ćelijske linije (npr. ćelije ovarijuma kineskog hrčka). Ćelijske linije se proveravaju na kontaminaciju mikoplazmom,

Neophodno je da se primeni odgovarajući medijum za kulture i uslovi inkubacije (npr. temperatura, posude za kulture, koncentracija CO2 i vlažnost).

Ispitivane supstance mogu da se pripreme u medijumu kulture ili da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima pre tretiranja ćelija. Konačna koncentracija vehikuluma u sistemu kulture ne sme u znatnoj meri da utiče na vijabilitet ćelija ili stepen rasta. Uticaj na učestalost SCE-a se prati putem kontrole rastvarača.

Ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu sisarskog egzogenog sistema metaboličke aktivacije. Alternativno, u slučajevima kada se koriste tipovi ćelija s intrinzičnom metaboličkom aktivnošću, obim i priroda aktivnosti odgovaraju klasi hemikalije koja se ispituje.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Broj kultura*

Za svaku tačku ispitivanja primenjuje se najmanje dve kulture.

*1.6.2.2. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

U svaki eksperiment se uključuju pozitivne kontrole i to primenom jedinjenja direktnog dejstva, kao i jedinjenja koje zahteva metaboličku aktivaciju. Potrebna je i primena kontrole vehikuluma.

Supstance koje se mogu primeniti kao pozitivne kontrole:

- jedinjenje direktnog delovanja;

- etil-metansulfonat;

- jedinjenje indirektnog delovanja;

- ciklofosfamid.

Kada je primereno, u ispitivanje može da se uključi dodatna pozitivna kontrola iste hemijske klase kojoj pripada i hemikalija koja se ispituje.

*1.6.2.3. Koncentracije izlaganja*

Potrebno je da se primeni najmanje tri odgovarajuće raspoređene koncentracije ispitivane supstance. Najviša koncentracija izaziva značajan toksični efekt, ali pri tome omogućava odgovarajuću replikaciju ćelija. Supstance koje su relativno nerastvorljive u vodi ispituju se do granice rastvorljivosti uz primenu odgovarajućih postupaka. U slučaju supstanci koje su slobodno rastvorljive u vodi i nisu toksične, gornja koncentracija ispitivane supstance utvrđuje se od slučaja do slučaja.

**1.6.3. Postupak**

*1.6.3.1. Priprema kultura*

Utvrđene ćelijske linije dobijaju se iz postojećih ("stock") kultura (npr. tripsinizacijom ili otresanjem), zasejavaju se u posude za kulture na odgovarajućoj gustini i inkubiraju na temperaturi od 37° C. Za jednoslojne kulture potrebno je prilagoditi broj ćelija po posudi, tako da kulture u vreme skupljanja ne budu konfluentne mnogo više od 50%. Alternativno, mogu da se primene ćelije u kulturi u obliku suspenzije. Kulture ljudskih limfocita dobijaju se iz heparinizirane krvi odgovarajućim tehnikama i inkubiraju se na temperaturi od 37° C.

*1.6.3.2. Tretiranje*

Ćelije koje se nalaze u eksponencijalnom stadijumu rasta izlažu se ispitivanoj supstanci u odgovarajućem vremenskom periodu. U većini slučajeva jedan do dva sata može da bude delotvorno, ali je u određenim situacijama moguće produžiti vreme tretiranja do dva cela ćelijska ciklusa. Ćelije bez dovoljne intrinzične (sopstvene) metaboličke aktivnosti izlažu se ispitivanoj hemikaliji u prisustvu i odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Po završetku perioda izlaganja sa ćelija se ispiraju ostaci ispitivane supstance pa se iste kultivišu tokom dva kruga replikacije u prisustvu BrdU. Kao alternativa može se primeniti postupak tokom kog se ćelije istovremeno izlažu ispitivanoj hemikaliji i BrdU tokom čitavog vremena kultivisanja od dva ćelijska ciklusa.

Kulture ljudskih limfocita tretiraju se dok se nalaze u polusinhronom stanju.

Analiza ćelija obavlja se tokom njihove druge deobe posle tretmana, kako bi se obezbedilo da najosetljiviji stadijumi ćelijskog ciklusa budu izloženi hemikaliji. Sa svim kulturama kojima se dodaje BrdU rukuje se u mraku ili uz prigušenu svetlost inkandescentnih lampi, sve do skupljanja ćelija, kako bi se fotoliza DNK koji sadrži BrdU svela na najmanju meru.

*1.6.3.3. Skupljanje ćelija*

Ćelijske kulture tretiraju se inhibitorom deobnog vretena (npr. kolhicinom) jedan do četiri sata pre skupljanja. Ćelije svake kulture ubiraju se i obrađuju odvojeno za preparate hromozoma.

*1.6.3.4. Preparati i bojenje hromozoma*

Hromozomski preparati pripremaju se primenom standardnih citogenetskih tehnika. Bojenje slajdova, kako bi se prikazali SCE, može da se izvede pomoću nekoliko tehnika (npr. fluorescencija plus Giemsa metoda).

**1.6.4. Analiza**

Broj analiziranih ćelija zasniva se na spontanoj kontrolnoj učestalosti SCE. Obično se za SCE analizira najmanje 25 dobro rasprostranjenih metafaza po kulturi. Slajdovi se pre analize šifriraju. Kod ljudskih limfocita analiziraju se samo metafaze koje sadrže 46 centromera. Kod utvrđenih ćelijskih linija analiziraju se samo metafaze koje sadrže ± 2 centromere modalnog broja. Navodi se da li se centromerna zamena oznake vrednuje kao SCE. Rezultati se potvrđuju u nezavisnom ispitivanju.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Broj SCE za svaku metafazu i broj SCE po hromozomu za svaku metafazu navode se odvojeno za sve tretirane i kontrolne kulture.

Podaci se procenjuju korišćenjem odgovarajućih statističkih metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- upotrebljenim ćelijama, metodama održavanja ćelijske kulture;

- uslovima ispitivanja: sastav medijuma, koncentracija CO2, koncentracija ispitivane supstance, korišćeni vehikulum, temperatura inkubacije, vreme tretiranja, korišćeni inhibitor deobnog vretena, njegova koncentracija i trajanje tretmana istim, vrsta korišćenog sisarskog sistema aktivacije, pozitivne i negativne kontrole;

- broju ćelijskih kultura po tački ispitivanja;

- detaljima tehnike korišćene za pripremu slajdova;

- broju analiziranih metafaza (podaci se navode odvojeno za svaku kulturu);

- prosečnom broju SCE po ćeliji i po hromozomu (podaci se navode odvojeno za svaku kulturu);

- kriterijumima za vrednovanje SCE;

- logičkoj osnovi za izbor doze;

- odnosu doza/odgovor, ako je primenljivo;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.20. ISPITIVANJE RECESIVNE LETALNOSTI VEZANE ZA POL NA DROSOPHILA-e MELANOGASTER**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivanjem recesivne letalnosti vezane za pol (u daljem tekstu: SLRL) kod Drosophila-e melanogaster otkriva se pojava mutacija, uključujući i tačkaste mutacije i male delecije, u zametnoj lozi insekta. Navedeno ispitivanje je analiza napredne mutacije, koja je sposobna za skrining mutacija na oko 800 lokusa (genskih mesta) na hromozomu X; što čini oko 80% svih lokusa hromozoma X. Hromozom X predstavlja približno jednu petinu čitavog haploidnog genoma.

Mutacije u hromozomu X Drosophila-e melanogaster fenotipski su izražene kod mužjaka koji nose mutirani gen. Kad je mutacija letalna u hemizigotnim uslovima, o njenom postojanju se zaključuje na osnovu izostanka jedne kategorije muških potomaka od dve kategorije koje normalno iznese heterozigotna ženka. SLRL ispitivanje koristi navedene činjenice pomoću posebno označenih i raspoređenih hromozoma.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

*1.6.1.1. Kulture soja*

Mogu se primeniti mužjaci kvalitetno definisane kulture soja divljeg tipa i ženki kulture soja Myller-5. Mogu se upotrebiti i ostale, dobro označene, ženske kulture soja s višestrukim invertiranim hromozomima X.

*1.6.1.2. Ispitivana supstanca*

Ispitivane supstance se rastvaraju u vodi. Supstance koje su nerastvorljive u vodi mogu da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućem vehikulumu (npr. smeši etanola i Tween-a 60 ili 80), a zatim pre primene da se razblaže u vodi ili rastvoru soli. Dimetilsulfoksid (u daljem tekstu: DMSO) se izbegava kao medijum.

*1.6.1.3. Broj životinja*

Ispitivanje je osmišljeno tako da ima unapred određenu osetljivost i snagu. Učestalost spontanih mutacija, koja bude primećena u odgovarajućem kontrolnom uzorku, u značajnoj meri utiče na broj tretiranih hromozoma koji se analiziraju.

*1.6.1.4. Put primene*

Izlaganje može biti: oralnim putem, putem injekcije ili izlaganje gasovima ili parama. Ispitivana supstanca može se dati i u rastvoru šećera. Kada je neophodno, materija može da se rastvori u 0,7% rastvoru NaCl i da se ubrizga u grudni koš ili abdomen.

*1.6.1.5. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

Neophodno je uključiti negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole. Ukoliko postoje odgovarajući laboratorijski podaci iz prethodnih ispitivanja, nisu potrebne istovremene kontrole.

*1.6.1.6. Nivoi izlaganja*

Primenjuju se tri nivoa izlaganja. Za preliminarnu procenu može da se primeni jedan nivo izlaganja ispitivanoj supstanci, s tim da navedeni nivo izlaganja treba da bude ili maksimalna tolerisana koncentracija ili ona koncentracija pri kojoj nastaju neki znaci toksičnosti. Za netoksične materije potrebno je izlaganje maksimalno mogućoj koncentraciji.

*1.6.2. Postupak*

Mužjaci divljeg tipa (stari tri do pet dana) tretiraju se ispitivanom supstancom i pojedinačno pare s velikim brojem nevinih ženki kulture soja Myller-5 ili druge kulture soja, označenim (višestrukim invertiranim hromozomima X) na odgovarajući način. Ženke se zamenjuju novim nevinim ženkama svaka dva do tri dana kako bi se obuhvatio čitav ciklus polne ćelije. Potomci navedenih ženki proveravaju se na postojanje letalnih efekta koji odgovaraju efektima na zrelom spermatozoidu, spermatidima u srednjoj ili kasnoj fazi, spermatidima u ranoj fazi, spermatocitima i spermatogonijima u vreme tretiranja ispitivanom supstancom.

Heterozigotnim F1 ženkama, dobijenima navedenim ukrštanjem, dopušteno je da se pojedinačno pare (tj. jedna ženka po bočici) sa svojom braćom. U F2 generaciji svaka se kultura proverava na odsustvo mužjaka divljeg tipa. Ukoliko se dogodi da kultura potiče od F1 ženke koja je nosilac smrtnosti u roditeljskom hromozomu X (tj. nije primećen nijedan mužjak s tretiranim hromozomom), kćeri ženke s istim genotipom obavezno se ispituju kako bi se utvrdilo da li se smrtnost ponavlja u narednoj generaciji.

**2. PODACI**

Podaci se navode u tabelarnom obliku kako bi se prikazao broj ispitanih hromozoma X, broj neplodnih mužjaka i broj letalnih hromozoma pri svakoj koncentraciji izlaganja i za svaki period parenja za svakog tretiranog mužjaka. Neophodno je navesti i brojeve grupa (klastera) različitih veličina po svakom mužjaku. Potrebno je da se dobijeni rezultati potvrde u posebnom ispitivanju.

Prilikom procene ispitivanja recesivne letalnosti vezane za pol primenjuju se odgovarajuće statističke metode. Grupisanje recesivnih smrtnih ishoda koji potiču od jednoga mužjaka razmatra se i procenjuje odgovarajućom statističkom metodom.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- kulturi soja: korišćene kulture soja ili sojevi Drosophila-e, starost insekata, broj tretiranih mužjaka, broj sterilnih mužjaka, broj utvrđenih F2 kultura, broj F2 kultura bez potomstva, broj hromozoma nosilaca letala koji su primećeni pri svakome stadijumu polne ćelije;

- kriterijumima za utvrđivanje veličine tretiranih grupa;

- uslovima ispitivanja, detaljan opis plana tretiranja i uzorkovanja, nivoe izlaganja, podatke o toksičnosti, negativne (rastvarač) i pozitivne kontrole, zavisno od konkretnog slučaja;

- kriterijumima za beleženje letalnih mutacija;

- odnosu izloženost/efekat, gde je moguće;

- proceni podataka;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.21. *IN VITRO* ISPITIVANJA TRANSFORMACIJE ĆELIJA SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Kulture ćelija sisara mogu da se koriste za otkrivanje fenotipskih promena *in vitro* izazvanih hemijskim supstancama koje su povezane s malignom transformacijom *in vivo*. Među ćelije koje se najviše primenjuju spadaju: C3H10T1/2, 3T3, SHE i ćelije pacova Fischer soja, dok se ispitivanja oslanjaju na promene u morfologiji ćelije, formiranju fokusa ili promene u zavisnosti od pričvršćivanja u polučvrstom agaru. Postoje i kulture ćelija koje se ređe koriste, a koje otkrivaju druge fiziološke ili morfološke promene u ćelijama posle izlaganja karcinogenim hemikalijama. Nijedna od *in vitro* krajnjih tačaka ispitivanja nema utvrđenu mehanističku vezu s rakom. Neke od kultura ćelija mogu da detektuju promotore tumora. Citotoksičnost može da se utvrdi merenjem efekta ispitivanog materijala na sposobnosti formiranja kolonija (efikasnost kloniranja) ili stepene rasta kultura. Merenje citotoksičnosti služi da se utvrdi da je izlaganje ispitivanoj hemikaliji bilo toksikološki relevantno, ali ne može da se upotrebi za izračunavanje transformacije: učestalosti kod svih analiza s obzirom da neke od njih mogu da uključuju produženu inkubaciju i/ili subkultivisanje.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

*1.6.1.1. Ćelije*

U zavisnosti od vrste ispitivanja transformacije koja se koristi, dostupne su različite ćelijske linije ili primarne ćelije. Ispitivač se stara da se kod ćelija koje se koriste u ispitivanju posle izlaganja poznatim karcinogenima pokaže odgovarajuća promena u fenotipu, kao i da se pobrine za to da je ispitivanje, u laboratoriji ispitivača, dokazanog i dokumentovanog kvaliteta i pouzdanosti.

*1.6.1.2. Medijum*

Neophodno je da se koristi medijum i eksperimentalni uslovi koji odgovaraju obliku ispitivanja transformacije koji se koristi.

*1.6.1.3. Ispitivana supstanca*

Ispitivane supstance mogu da se pripreme u medijumu kulture ili da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima pre tretiranja ćelija. Konačna koncentracija vehikuluma u sistemu kulture ne sme da utiče na vijabilitet ćelija, stepen rasta ili učestalost transformacija.

*1.6.1.4. Metabolička aktivacija*

Ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Alternativno, kada se koriste tipovi ćelija sa intrinzičnom (sopstvenom) metaboličkom aktivnošću, priroda aktivnosti odgovara kategoriji (klasi) hemikalije koja se ispituje.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

U svako ispitivanje se uključuju pozitivne kontrole i to primenom jedinjenja direktnog delovanja, kao i jedinjenja koje zahteva metaboličku aktivaciju. Neophodno je primeniti i negativne kontrole (vehikuluma).

Supstance koje se mogu primeniti kao pozitivne kontrole su:

a) Hemikalije direktnog delovanja:

- etil metansulfonat;

- b propiolakton.

b) Jedinjenja koji zahtevaju metaboličku aktivaciju:

- 2- acetil aminofluoren;

- 4-dimetilaminoazobenze;,

- 7,12-dimetilbenz[a]antracen.

Kad je primereno, u ispitivanje se uključuje dodatna pozitivna kontrola iste hemijske kategorije kojoj pripada i jedinjenje koji se ispituje.

*1.6.2.2. Koncentracije izlaganja*

Neophodno je da se primeni nekoliko koncentracija ispitivane supstance. Navedene koncentracije treba da izazovu toksične efekte zavisne od koncentracije, pri čemu najviša koncentracija uzrokuje nizak stepen preživljenja, dok je preživljenje kod najniže koncentracije slično onome kod negativne kontrole. Supstance koje su relativno nerastvorljive u vodi ispituju se do granice rastvorljivosti, uz primenu odgovarajućih postupaka. U slučaju supstanci koje su netoksične i dobro rastvorljive u vodi, gornja koncentracija ispitivane supstance utvrđuje se posebno za svaki pojedinačni slučaj.

**1.6.3. Postupak**

Ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci tokom odgovarajućeg vremenskog perioda, u zavisnosti od sistema koji se koristi u ispitivanju. U slučaju produženog izlaganja, može se uključiti ponovljeno doziranje praćeno promenom medijuma (i ukoliko je potrebno, svežom smešom za metaboličku aktivaciju). Ćelije bez dovoljne intrinzične (sopstvene) metaboličke aktivnosti izlažu se ispitivanoj supstanci u prisustvu i odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Po završetku perioda izlaganja sa ćelija se ispiraju ostaci ispitivane supstance i iste ćelije se kultivišu pod uslovima koji su primereni za pojavu transformisanog fenotipa koji se posmatra, a posle čega se utvrđuje incidenca transformacije. Svi rezultati potvrđuju se u okviru nezavisnog ispitivanja.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno i mogu biti različito formulisani zavisno od oblika ispitivanja koji se koristi, na primer: broj podloga, pozitivne podloge ili broj transformisanih ćelija. Kad odgovara, stepen preživljavanja se izražava u obliku procenta od kontrolnih nivoa. Učestalost transformacija izražava se kao broj transformanata prema broju preživelih. Podaci se procenjuju primenom odgovarajućih statističkih metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenom tipu ćelija, broju ćelijskih kultura, metodama održavanja ćelijskih kultura;

- uslovima ispitivanja: koncentracija ispitivane supstance, korišćeni medijum, vreme inkubacije, trajanje i učestalost tretiranja, gustina ćelija tokom tretmana, vrsta korišćenog egzogenog sistema metaboličke aktivacije, pozitivne i negativne kontrole, detaljan opis fenotipa koji se posmatra, korišćeni selektivni sistem (zavisno od slučaja), logička osnova za izbor doze;

- metodi korišćenoj za prebrojavanje vijabilnih i transformisanih ćelija;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

**3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA**

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNE LETALNOSTI NA GLODARIMA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Efekti dominantne letalnosti za posledicu imaju embrionalnu ili fetalnu smrt. Indukcija dominantnih letala izlaganjem hemijskoj supstanci ukazuje na činjenicu da je supstanca delovala na germinativno tkivo ispitivane životinjske vrste. Opšteprihvaćeno mišljenje je da su dominantni letali posledica hromozomskih oštećenja (strukturnih i numeričkih anomalija). U slučaju tretiranja ženki ispitivanom supstancom, embrionalna smrt može da bude i posledica toksičnih dejstava.

Obično se mužjaci izlažu delovanju ispitivanog jedinjenja i potom se pare s netretiranim nevinim ženkama. Primenom sekvencijalnih intervala parenja moguće je odvojeno ispitati različite stadijume polnih ćelija. Povećanje broja mrtvih implanta po svakoj ženki u tretiranoj grupi u odnosu na broj mrtvih implanta po svakoj ženki u kontrolnoj grupi odražava postimplantacioni gubitak. Predimplantacioni gubitak može da se proceni na osnovu broja žutih tela ili poređenjem ukupnoga broja implanta po svakoj ženki u kontrolnoj i tretiranoj grupi. Ukupan efekt dominantne letalnosti predstavlja zbir pred- i post-implantacionog gubitka. Procena ukupnoga efekta dominantne letalnosti zasniva se na poređenju živih implanta po svakoj ženki u ispitivanoj grupi i živih implanta po svakoj ženki u kontrolnoj grupi. Smanjenje broja implanta u određenim vremenskim razmacima može biti posledica ubijanja ćelija (tj. spermatocita i/ili spermatogonija).

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Kada je moguće, ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u izotoničnom rastvoru. Hemikalije nerastvorljive u vodi mogu da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućim medijumima. Medijum koji se koristi ne sme da interferira sa ispitivanom hemikalijom, niti za posledicu da ima toksične efekte. Neophodna je upotreba svežih rastvora/suspenzija ispitivane hemikalije.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Put primene*

Ispitivano jedinjenje uglavnom se primenjuje samo jednom. Na osnovu toksikoloških podataka može se primeniti plan ponovljenog tretiranja. Uobičajeni putevi primene su oralna intubacija ili intraperitonealna injekcija. Mogu da odgovaraju i drugi putevi primene.

*1.6.2.2. Eksperimentalne životinje*

Kao odgovarajuće vrste za ispitivanje preporučuju se pacovi i miševi. Zdrave i potpuno polno zrele životinje nasumično se biraju i dodeljuju grupama koje se tretiraju i kontrolnim grupama.

*1.6.2.3. Broj i pol*

Koristi se odgovarajući broj tretiranih mužjaka, uzimajući u obzir spontano variranje bioloških svojstava koja se vrednuju. Izabrani broj se zasniva na unapred određenoj osetljivosti detekcije i stepena značaja. Na primer, u tipičnom ispitivanju, broj mužjaka u svakoj grupi koja prima određenu dozu je dovoljan da se obezbedi između 30 i 50 gravidnih ženki po svakom intervalu parenja.

*1.6.2.4. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

U svaki eksperiment se uključuju istovremene pozitivne i negativne (medijum) kontrole. Kad postoje prihvatljivi rezultati pozitivne kontrole iz eksperimenata koji su nedavno obavljeni u istoj laboratoriji, oni se mogu koristiti umesto istovremene pozitivne kontrole. Supstance pozitivne kontrole koriste se u prikladnoj niskoj dozi (npr. MMS, intraperitonealno pri 10 mg/kg), a kako bi se pokazala osetljivost ispitivanja.

*1.6.2.5. Dozni nivoi*

Obično se koriste tri nivoa doza. Visoka doza prouzrokuje znakove toksičnosti ili smanjene plodnosti tretiranih životinja. U određenim slučajevima jedna visoka doza može da bude dovoljna.

*1.6.2.6. Ispitivanje granične doze*

Netoksične supstance traba ispitati pri dozi od 5 g/kg u obliku jedne doze, ili pri dozi od 1 g/kg/dnevno prilikom ponovljenog doziranja.

**1.6.3. Postupak**

Postoji nekoliko planova za izvođenje postupka. Najviše se primenjuje doziranje ispitivane supstance u obliku jednokratne primene. Mogu se primeniti i drugi planovi tretiranja.

Pojedini mužjaci se sekvencijalno pare s jednom ili dve netretirane nevine ženke u odgovarajućim vremenskim intervalima posle tretiranja ispitivanom supstancom. Ženke je potrebno ostaviti zajedno s mužjacima tokom najmanje jednog estrusnog ciklusa ili dok ne dođe do parenja koje se utvrđuje prema prisutnosti sperme u vagini ili prema postojanju vaginalnog "čepa".

Broj parenja posle tretiranja rukovodi se planom tretiranja i obezbeđuje uzorkovanje svih stadijuma polnih ćelije posle tretiranja.

Ženke se lišavaju života na human način u drugoj polovini graviditeta i pregleda se sadržaj materice kako bi se utvrdio broj živih i mrtvih implanta. Mogu se pregledati i jajnici kako bi se utvrdio broj žutih tela.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno kako bi se prikazao broj mužjaka, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultati svakoga parenja, uključujući identitet svakog mužjaka i ženke, navode se pojedinačno. Potrebno je zabeležiti nedelju parenja za svaku ženku, veličinu doze koju su primili mužjaci, kao i učestalosti pojave živih i mrtvih implanta.

Izračunavanje ukupnog efekta dominantne letalnosti zasniva se na poređenju živih implanta po svakoj ženki u ispitivanoj grupi sa živim implantima po svakoj ženki u kontrolnoj grupi. Odnos mrtvih i živih implanta iz tretirane grupe u poređenju sa odnosom u kontrolnoj grupi analizira se kako bi se pokazao postimplantacioni gubitak.

Ukoliko se podaci navode u obliku ranih i kasnih smrti, u tabelama se to jasno naznačava. Navodi se i predimplantacioni gubitak, ukoliko je procenjen. Predimplantacioni gubitak može se izračunati kao razlika između broja žutih tela i broja implanta ili kao smanjenje prosečnog broja implanta po materici, a u poređenju sa kontrolnim parenjima.

Podaci se procenjuju primenom odgovarajućih statističkih metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- životinjskoj vrsti, soju, starosti i telesnoj masi korišćenih životinja, broju životinja svakoga pola u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;

- ispitivanoj supstanci, medijumu, ispitanim nivoima doza i logičkoj osnovi za izbor doza, negativnoj i pozitivnoj kontroli, toksičnosti;

- putu i planu primene;

- rasporedu parenja;

- metodama koje su korišćene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja;

- vremenu lišavanja života na human način;

- kriterijumima beleženja dominantnih letala;

- odnosu doza/efekat, ako je primenljivo;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.23. ISPITIVANJE HROMOZOMSKIH ABERACIJA NA SPERMATOGONIJIMA SISARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

*1.1. UVOD*

Svrha ispitivanja hromozomskih aberacija u spermatogonijima sisara *in vivo* jeste identifikacija supstanci koje uzrokuju strukturalne hromozomske aberacije u ćelijama spermatogonija sisara**1, 2, 3, 4, 5**. Strukturalne aberacije mogu biti dvojake: hromozomskog ili hromatidnog tipa. Većina hemijskih mutagena uzrokuje aberacije hromatidnog tipa, ali ponekad se pojavljuju i aberacije hromozomskog tipa. Ova metoda nije namenjena merenju numeričkih aberacija i obično se ne upotrebljava u tu svrhu. Hromozomske mutacije i sa njima povezane pojave uzrok su mnoštva genetskih oboljenja kod ljudi.

Ovo ispitivanje meri hromozomske pojave u zametnim ćelijama spermatogonija i od njega se očekuje da bude uspešno u predviđanju indukovanja naslednih mutacija u polnim ćelijama.

U ovom ispitivanju obično se upotrebljavaju glodari. Navedeno citogenetsko ispitivanje *in vivo* otkriva hromozomske aberacije prilikom mitoze spermatogonija. Ostale ciljne ćelije nisu predmet ove metode.

Da bi se otkrile aberacije hromatidnog tipa u ćelijama spermatogonija potrebno je ispitati prvu mitotsku deobu ćelija posle tretmana, a pre nego što navedene lezije nestanu u narednim ćelijskim deobama. Dodatni podaci o tretiranim matičnim ćelijama spermatogonija mogu se dobiti analizom aberacija hromozomskoga tipa kod mejotskih hromozoma prilikom dijakineze-metafaze 1 kada tretirane ćelije postaju spermatociti.

Svrha ovoga ispitivanja *in vivo* jeste ispitati da li su mutageni somatskih ćelija aktivni i u polnim ćelijama. Uz to, ovo ispitivanje na spermatogonijima odgovara i za ocenjivanje mutagenosti, zbog toga što omogućava uzimanje u obzir faktor metabolizma *in vivo*, farmakokinetike i procesa popravka DNK.

U testisu se nalaze brojne generacije spermatogonija koje imaju različite nivoe osetljivosti na hemijski tretman. Otkrivene aberacije predstavljaju zbirnu reakciju tretiranih ćelijskih populacija spermatogonija, pri čemu preovlađuju diferencirane ćelije spermatogonija koje su brojnije. Zbog fizičke i fiziološke barijere Sertolijevih ćelija i barijere između krvi i testisa, različite generacije spermatogonija mogu ili ne moraju biti izložene krvotoku, zavisno od njihovog položaja u testisima.

Ovaj oblik ispitivanja ne odgovara ukoliko se pojave dokazi da ispitivana supstanca ili reaktivni metabolit neće dospeti do ciljnog tkiva.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Aberacija hromatidnog tipa jeste strukturalno oštećenje hromozoma koje se izražava kao cepanje pojedinih hromatida ili cepanje i ponovno sjedinjavanje između hromatida.

Aberacija hromozomskog tipa jeste strukturno oštećenje hromozoma koje se izražava kao cepanje ili cepanje i ponovno sjedinjavanje obe hromatide na identičnom mestu.

Hromozomski prekid jeste ahromatska lezija manja od širine jedne hromatide s minimumom neporavnatošću hromatida.

Numerička aberacija jeste promena u broju hromozoma koja odstupa od redovnog broja karakterističnog za životinje koje se koriste.

Poliploidnost jeste umnožak haploidnog broja hromozoma (n) različit od diploidnog broja (tj. 3n, 4n, itd).

Strukturna aberacija jeste promena u strukturi hromozoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom metafaznog stadijuma deobe ćelija, a koja se zapaža u obliku delecija, transpozicija ili recipročnih translokacija.

*1.3. PRINCIP METODE*

Životinje se odgovarajućim putem ekspozicije izlažu ispitivanoj supstanci i lišavaju života u odgovarajuće vreme posle tretiranja. Pre lišavanja života na human način, životinje se tretiraju supstancom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemid-om®). Posle toga, pripreme se i oboje hromozomski preparati od polnih ćelija i analiziraju ćelije u metafazi s ciljem utvrđivanja hromozomskih aberacija.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Izbor životinjske vrste*

Obično se koriste kineski hrčci i miševi muškoga pola. Mogu se primeniti i mužjaci druge odgovarajuće vrste sisara. Koriste se laboratorijski sojevi mladih zdravih odraslih životinja koji se obično koriste. Na početku istraživanja odstupanje u telesnoj masi životinja treba da bude minimalno i da ne premašuje ± 20% prosečne telesne mase.

*1.4.1.2. Uslovi smeštaja i ishrane*

Primenjuju se opšti uslovi koji su navedeni u Opštem uvodu, iako se vlažnost održava na nivou od 50% do 60%.

*1.4.1.3. Priprema životinja*

Zdravi odrasli mužjaci se, po metodi slučajnog izbora, svrstavaju u kontrolne i eksperimentalne grupe. Kavezi su raspoređeni na način kojim će efekti koji su posledica položaja kaveza biti svedeni na najmanju moguću meru. Životinje se označavaju na jedinstven način. Životinje se aklimatizuju na laboratorijske uslove najmanje pet dana pre početka ispitivanja.

*1.4.1.4. Priprema doza*

Čvrste ispitivane supstance rastvaraju se ili suspenduju u odgovarajućim rastvaračima ili vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razređuju pre doziranja životinja. Tečne ispitivane supstance mogu direktno da se doziraju ili razrede pre doziranja. Koriste se sveže pripremljeni preparati ispitivane supstance, osim ako podaci o stabilnosti ukazuju da je čuvanje prihvatljivo.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Rastvarač/vehikulum*

Rastvarač/vehikulum ne sme da ima toksične efekte pri nivou doza koje se primenjuju i ne sme da postoji sumnja da će hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se primenjuju manje poznati rastvarači/vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje se opravdava podacima o njihovoj kompatibilnosti. Kad god je moguće, preporučuje se da se prvo razmotri primena vodenog rastvarača/vehikuluma.

*1.4.2.2. Kontrole*

Istovremene pozitivne i negativne (rastvarač/vehikulum) kontrole uključuju se u svako ispitivanje. Osim tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnim grupama se postupa na isti način kao sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole izazivaju strukturne hromozomske aberacije u ćelijama spermatogonija *in vivo* pri istim nivoima izloženosti za koje se očekuje da će izazvati primetno povećanje u odnosu na podlogu.

Pozitivne kontrolne doze se biraju tako da efekti budu jasni, ali da licu koje čita eksperiment odmah ne otkriju identitet šifriranih mikroskopskih preparata (slajdova). Prihvatljivo je da se pozitivne kontrole primene putem koji je različit od onoga kod ispitivane supstance i da se uzorak uzme samo jednom. Kada je moguće uzima se u obzir primena hemikalija pozitivne kontrole koje pripadaju istoj hemijskoj kategoriji kao i ispitivana hemikalija. Primeri supstanci pozitivne kontrole:

Tabela 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS br. | EINECS br. |
| ciklofosfamid ciklofosfamid monohidrat | 50-18-0 6055-19-2 | 200-015-4 |
| cikloheksilamin | 108-91-8 | 203-629-0 |
| mitomicin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| monomerni akrilamid | 79-06-1 | 201-173-7 |
| trietilenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Negativne kontrole, tretirane samo rastvaračem ili vehikulumom, inače tretirane na isti način kao grupe obuhvaćene tretmanom, uključuju se u svako vreme uzorkovanja, osim ukoliko se, iz prošlih kontrolnih podataka, mogu ekstrapolirati prihvatljive među-životinjske varijabilnosti i frekventnost ćelija s hromozomskim aberacijama. Istovremeno se koriste i netretirane kontrole, osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz prošlih ispitivanja ili objavljeni kontrolni podaci koji dokazuju da odabran rastvarač/vehikulum ne izaziva štetne ili mutagene efekte.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Broj životinja**

Svaka tretirana i kontrolna grupa obuhvata najmanje pet mužjaka na kojima se može obaviti analiza.

**1.5.2. Plan tretmana**

Ispitivane supstance je najbolje davati jednom ili dvaput (tj. u okviru jednog ili dva tretmana). Ispitivane supstance mogu da se daju u obliku podeljene doze, tj. u obliku dva tretmana tokom istoga dana u razmaku od najviše nekoliko sati, a kako bi se olakšalo davanje velike količine materijala. Ostali režimi doziranja naučno se opravdavaju.

U najvišoj doznoj grupi uzorkovanje se vrši dva puta posle tretiranja. S obzirom da ispitivana supstance može da utiče na dinamiku ćelijskoga ciklusa, jedno uzorkovanje se obavlja ranije, oko 24 sata posle tretmana, a drugo kasnije, oko 48 sati posle tretmana. Kod ostalih doza, različitih od najviše doze, uzorke je potrebno uzeti 24 sata ili 1,5 dužinu ćelijskog ciklusa posle tretmana, osim ukoliko je poznato da bi drugo vreme uzorkovanja bilo prikladnije za otkrivanje efekata**6**.

Dodatni uzorci mogu da se uzimaju i u drugo vreme, npr. u slučaju hemikalija koje mogu da dovedu do zaostajanje hromozoma ili efekte nezavisne od S-faze, primerenije je da se uzorkovanje obavi ranije**1**.

Primerenost plana ponovljenog tretiranja utvrđuje se od slučaja do slučaja. Posle programa ponovljenog tretiranja, životinje se lišavaju života na human način 24 sata (1,5 dužina ćelijskog ciklusa) posle poslednjeg unosa ispitivane supstance. Kad je potrebno, mogu se uzeti i dodatni uzorci u drugo vreme.

Pre lišavanja života na human način životinjama se intraperitonealno injektuje odgovarajuća doza supstance za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid-a® ili kolhicina). Zatim se uzimaju životinjski uzorci u odgovarajućim intervalima. Za miševe ovaj interval iznosi oko 3 do 5 sati; za kineske hrčke interval iznosi oko 4 do 5 sati.

**1.5.3. Dozni nivoi**

Ukoliko se istraživanje obavlja sa ciljem utvrđivanja raspona zbog toga što ne postoje odgovarajući podaci, navedeno istraživanje se obavlja u istoj laboratoriji, uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima tretiranja koji će biti primenjeni u glavnom istraživanju**7**. Ukoliko postoji toksičnost, prilikom prvog intervala uzorkovanja koriste se tri nivoa doziranja. Ovi nivoi doziranja obuhvataju raspon od maksimalne do minimalne toksičnosti ili bez toksičnosti. Prilikom kasnijeg intervala uzorkovanja potrebno je upotrebiti samo najvišu dozu. Najviša doza se definiše kao doza usled koje nastaju simptomi toksičnosti takve prirode da se očekuje da bi veći nivoi doziranja, zasnovani na istom režimu doziranja, izazvali smrt.

Supstance specifičnog biološkog delovanja u malim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogena) izuzetak su od kriterijuma za postavljanje doza, pa se vrednuju od slučaju do slučaja. Najviša doza se može definisati i kao doza koja dovodi do nekih indikacija toksičnosti u ćelijama spermatogonija (npr. smanjenje odnosa između mitoza spermatogonija u prvoj i drugoj mejotskoj metafazi; navedeno smanjenje ne sme da bude veće od 50%).

**1.5.4. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko prilikom ispitivanja jednom dozom, na nivou od najmanje 2.000 mg/kg TM/dnevno u okviru jednog tretmana ili dva tretmana tokom istoga dana, ne nastanu nikakvi primetni toksični efekti i ukoliko se genotoksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, nije neophodno celokupno ispitivanje koje primenjuje tri nivoa doziranja. Očekivana izloženost ljudi može ukazati na potrebu za primenom veće doze tokom ispitivanja granične doze.

**1.5.5. Primena doza**

Ispitivana supstanca obično se primenjuje intubacijom (prisilno hranjenje), i to korišćenjem želudačne cevi ili odgovarajuće intubacijske kanile ili intraperitonealnom injekcijom. Ostali putevi izlaganja mogu da budu prihvatljivi u slučajevima u kojima se mogu opravdati. Maksimalna zapremina tečnosti koja može da se da odjednom putem cevi ili injekcijom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme da pređe 2 ml/100 g TM. Upotrebu većih zapremina potrebno je opravdati. Izuzev u slučaju iritabilnih i korozivnih supstanci koje normalno pokazuju pogoršane efekte pri višim koncentracijama, varijabilnost ekperimentalne zapremine svodi se na najmanju moguću meru prilagođavanjem koncentracije, a kako bi se osigurala konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

**1.5.6. Hromozomski preparat**

Odmah posle lišavanja života na human način iz jednog ili oba testisa uzimaju se ćelijske suspenzije koje se izlažu hipotoničnom rastvoru i fiksiraju. Ćelije se zatim nanesu na mikroskopska stakla i oboje.

**1.5.7. Analiza**

Za svaku životinju se analizira najmanje 100 dobro vidljivih metafaza (tj. najmanje 500 metafaza po grupi). Navedeni broj se može smanjiti kada se uočava veliki broj aberacija. Sve preparate (slajdove), uključujući one pozitivne i negativne kontrole, potrebno je nezavisno šifrirati pre mikroskopske analize. S obzirom da postupci fiksiranja često za posledicu imaju oštećenje proporcija metafaza uz gubitak hromozoma, vrednovane ćelije zbog toga sadrže broj centromera jednak broju 2n ± 2.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci koji se odnose na pojedine životinje prikazuju se tabelarno. Životinja predstavlja eksperimentalnu jedinicu. Za svaku pojedinu životinju potrebno je utvrditi broj ćelija sa strukturnim hromozomskim aberacijama i broj hromozomskih aberacija po ćeliji. Navode se različite vrste strukturnih hromozomskih aberacija zajedno sa njihovim brojevima i frekvencama, a u odnosu na tretirane i kontrolne grupe. Hromozomski prekidi navode se odvojeno i o njima se izveštava, ali se uglavnom ne uključuju u ukupnu frekvencu aberacija.

Ukoliko se posmatraju i mitoza i mejoza, potrebno je utvrditi odnos između mitoza spermatogonija u prvoj i drugoj mejotskoj metafazi kao merilo citotoksičnosti za sve tretirane životinje i životinje negativne kontrole na čitavom uzorku od 100 ćelija u deobi po životinji, da bi se utvrdili mogući citotoksični efekti. Ukoliko se posmatra samo mitoza, potrebno je utvrditi mitotski indeks u najmanje 1.000 ćelija za svaku životinju.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao što je dozno zavisno povećanje relativnog broja ćelija s hromozomskim aberacijama ili jasno povećanje broja ćelija sa aberacijama u grupi koja je primala po jednu dozu prilikom pojedinog intervala uzorkovanja. Prvenstveno se uzima u obzir biološka relevantnost rezultata. Prilikom procene rezultata ispitivanja mogu da se primene statističke metode kao pomoćno sredstvo**8**. Statistički značaj ne treba da bude jedini faktor pomoću kojeg se utvrđuje pozitivan odgovor. Dvosmisleni rezultati se pojašnjavaju ispitivanjem, najbolje kroz modifikaciju eksperimentalnih uslova.

Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju navedene kriterijume, smatra se nemutagenom u ovom ispitivanju.

Iako većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima utvrđeni podaci onemogućavaju donošenje konačne odluke o delovanju ispitivane supstance. Rezultati mogu ostati dvosmisleni ili nejasni, bez obzira koliko je puta eksperiment ponovljen.

Pozitivni rezultati ispitivanja hromozomskih aberacija u spermatogonijima *in vivo* ukazuju na to da ispitivana supstanca uzrokuje strukturne hromozomske aberacije u polnim ćelijama ispitane vrste. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva hromozomske aberacije u polnim ćelijama ispitane vrste.

Potrebno je razmotriti verovatnoću da će ispitivana supstanca ili njeni metaboliti dopreti do ciljnog tkiva.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Rastvaraču/vehikulumu:

- opravdanost izbora vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u rastvaraču/vehikulumu, ukoliko je poznato.

2) Eksperimentalnim životinjama:

- upotrebljena vrsta/soj;

- broj i starost životinja;

- poreklo, smeštajni uslovi, ishrana, itd.;

- pojedinačna težina životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon telesne mase i srednju vrednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:

- podaci istraživanja za utvrđivanje raspona, ukoliko je obavljeno;

- logička osnova za izbor nivoa doziranja;

- logička osnova za izbor načina primene ispitivane supstance;

- detalji pripreme ispitivane supstance;

- detalji primene ispitivane supstance;

- logička osnova vremena lišavanja života na human način;

- način preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg TM/dan), ukoliko je primenljivo na konkretan slučaj;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- detaljan opis rasporeda tretmana i uzorkovanja;

- metode merenja toksičnosti;

- identitet supstance koja zaustavlja metafazu, njena koncentracija i trajanje tretmana;

- metode pripreme mikroskopskih preparata;

- kriterijumi za prebrojavanje aberacija;

- broj analiziranih ćelija po životinji;

- kriterijumi za proglašavanje ispitivanja pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

4) Rezultatima:

- simptomi toksičnosti;

- mitotski indeks;

- odnos između mitoza spermatogonija u prvoj i drugoj mejotskoj metafazi;

- vrsta i broj aberacija, zasebno prikazanih za svaku životinju;

- ukupan broj aberacija po grupi;

- broj ćelija sa aberacijama po grupi;

- odnos doza/efekat, gde je moguće;

- statističke analize, ukoliko postoje;

- podaci istovremene negativne kontrole;

- negativni kontrolni podaci prošlih istraživanja s rasponima i srednjim vrednostima i standardnim devijacijama;

- podaci istovremene pozitivne kontrole;

- promene u ploidnosti (broju hromozomske strukture ćelije), ukoliko su primećene.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

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

5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N.(1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

**B.24. SPOT TEST NA MIŠEVIMA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ovo je *in vivo* ispitivanje na miševima prilikom kog se hemikalijama izlažu embrioni u razvoju. Ciljne ćelije u embrionima u razvoju su melanoblasti, dok su ciljni geni oni koji kontrolišu pigmentaciju dlake krzna. Embrioni u razvoju su heterozigotni kod niza ovih gena koji uslovljavaju boju krzna. Mutacija ili gubitak (zbog niza genetskih pojava) dominantnih alela takvog gena u melanoblastu ima za posledicu ekspresiju recesivnog fenotipa u ćelijama koje potom nastaju, stvarajući mrlju drugačije boje na krznu dobijenog miša. Broj potomaka s mrljama, mutacijama, prebroji se i učestalost njihovog javljanja upoređuje se s onom koja se javlja među potomcima koji nastanu iz embriona tretiranih isključivo rastvaračem. Test mrlje u miša otkriva pretpostavljene somatske mutacije u fetalnim ćelijama.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Kada može, ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u izotoničnom rastvoru. Hemikalije koje su nerastvorljive u vodi rastvaraju se ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima. Vehikulum koji se koristi ne sme da interferira sa ispitivanom hemikalijom, niti da uzrokuje toksične efekte. Neophodna je primena svežih preparata ispitivane hemikalije.

*1.6.1.1. Eksperimentalne životinje*

Miševi T soja (jednobojni bez uzorka, a/a; činčila, ružičaste oči, cch p/cch p; smeđi, b/b; blage boje, kratke uši, d se/d se; šarene mrlje, s/s) pare se ili sa HT sojem (bleda boja, jednobojni bez uzorka, kratki udovi, pa a bp/pa a bp; nejasno olovnosivi, ln fz/ln fz; sedefasti pe/pe) ili sa C57BL (jednobojni bez uzorka, a/a). Mogu se koristiti i ostali odgovarajući oblici ukrštanja, kao što su NMRI (jednobojni bez uzroka, a/a; albino, c/c) i DBA (jednobojni bez uzorka, a/a; smeđi b/b; blage boje d/d) ako se dobiju jednobojni potomci.

*1.6.1.2. Broj i pol*

Tretira se dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se osigurao odgovarajući broj preživelih potomaka za svaki dozni nivo koja se primenjuje. Odgovarajuća veličina uzorka reguliše se zavisno od broja mrlja zapaženih kod tretiranih miševa i raspona kontrolnih podataka. Negativan rezultat prihvatljiv je samo kada je procenjivanje sprovedeno na najmanje 300 potomaka ženki tretiranih najvišom dozom.

*1.6.1.3. Primena pozitivnih i negativnih kontrola (kontrolnih uzoraka)*

Neophodno je da postoje podaci o istovremenim kontrolama miševa koji su tretirani samo medijumom (negativne kontrole). Mogu se sjediniti kontrolni podaci iz prethodnih istraživanja iste laboratorije kako bi se povećala osetljivost ispitivanja, ako su navedena ispitivanja homogena. Podaci o pozitivnoj kontroli koji su nedavno dobijeni u istoj laboratoriji posle tretmana hemikalijom koja je pokazala mutagenost ovim testom, treba da budu dostupni ukoliko se ne primeti mutagenost ispitivane hemikalije.

*1.6.1.4. Put primene*

Uobičajeni putevi primene uključuju oralnu intubaciju ili intraperitonealno ubrizgavanje supstance gravidnim ženkama. Obavljanje tretmana inhalacijom ili drugim putevima primene koristi se kada to odgovara.

*1.6.1.5. Dozni nivoi*

Primenjuju se bar dva dozna nivoa, uključujući jednu kod koje se javljaju simptomi toksičnosti ili smanjenje veličine legla. Kod netoksičnih hemikalija potrebno je izlaganje maksimalnoj mogućoj dozi.

**1.6.2. Postupak**

Obavlja se jedan tretman tokom osmog, devetog ili desetog dana trudnoće, pri čemu se kao prvi dan broji onaj dan kada je prvi put primećen vaginalni "čep". Ovi dani odgovaraju vremenu od 7,25, 8,25 i 9,25 dana posle začeća. Mogu se primeniti i sukcesivni tretmani tokom navedenih dana.

*1.6.2.1. Analiza*

Potomci se šifriraju i posmatraju na postojanje mrlja između treće i četvrte nedelje posle rođenja. Razlikuju se tri kategorije mrlja:

a) bele mrlje unutar 5 mm od središnje ventralne (trbušne) linije za koje se pretpostavlja da su posledica ubijanja ćelija (u daljem tekstu:WMVS);

b) žute mrlje, nalik aguti boji, vezane uz područja grudi, genitalija, grla, područja pazuha i prepona i na sredini čela; za njih se pretpostavlja da su posledica pogrešne diferencijacije (u daljem tekstu: MDS);

v) pigmentne i bele mrlje slučajno raspoređene po krznu za koje se pretpostavlja da su posledica somatskih mutacija (u daljem tekstu: RS).

Vrednovanje se obavlja u sve tri kategorije, ali je samo poslednja, RS, od genetske važnosti. Poteškoće u razlikovanju MDS i RS mogu se rešiti fluorescentnom mikroskopijom uzoraka dlake.

Neophodno je zabeležiti očigledne makro morfološke abnormalnosti potomaka.

**2. PODACI**

Podaci se navode u obliku ukupnog broja vrednovanih potomaka i broja kod koga se pojavila jedna ili više mrlja za koje se pretpostavlja da su posledica somatske mutacije. Podaci o tretiranju upoređuju se sa podacima negativne kontrole primenom odgovarajućih metoda. Podaci se prikazuju na osnovi pojedinih legala.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- sojevima upotrebljenim za ukrštanje;

- broju gravidnih ženki u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;

- prosečnoj veličini legla u eksperimentalnim i kontrolnim grupama prilikom okota i prestanka dojenja;

- nivoima doza ispitivane hemikalije;

- upotrebljenom rastvaraču;

- danu gravidnosti na koji je tretman primenjen;

- načinu primene tretmana;

- ukupnom broju vrednovanih potomaka i broju sa WMVS, MDS i RS u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;

- uočljivim morfološke abnormalnostima;

- odnosu doze/efekat kod RS-a kada je moguće;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.25. NASLEĐENA TRANSLOKACIJA KOD MIŠA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivanje nasleđene translokacije kod miša otkriva strukturne i numeričke hromozomske promene u polnim ćelijama sisara koje se pojavljuju kod potomstva prve generacije. Vrste otkrivenih hromozomskih promena obuhvataju recipročne translokacije i, ukoliko je uključeno potomstvo ženskog pola, gubitak hromozoma X. Kod nosilaca translokacija i XO-ženki javlja se smanjena plodnost koja se koristi za izbor F1 potomstva u svrhu citogenetske analize. Potpunu sterilnost izazivaju određene vrste translokacija (autozomni gen X (autozom) i c-t tip). Translokacije se citogenetski posmatraju u mejotskim ćelijama tokom dijakineze - metafaze 1 kod jedinki mužjaka, bilo F1 mužjaka ili potomaka muškog pola F1 ženki. XO-ženke citogenetski se identifikuju na osnovu postojanja samo 39 hromozoma tokom mitoza koštane srži.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Hemikalije koje se ispituju rastvaraju se u izotoničnom rastvoru. Ukoliko su hemikalije nerastvorljive, suspenduju se u odgovarajućim vehikulumima. Koriste se sveže pripremljeni rastvori ispitivane supstance. Ukoliko se zbog lakšeg doziranja koristi vehikulum, on ne sme da interferira sa ispitivanim jedinjenjem, niti da uzrokuje toksične efekte.

*1.6.1.1. Put primene*

Putevi primene obično obuhvataju oralnu intubaciju ili intraperitonealne injekcije. Mogu da odgovaraju i drugi putevi primene.

*1.6.1.2. Eksperimentalne životinje*

Zbog lakšeg razmnožavanja i citološke verifikacije, eksperimenti se obavljaju na miševima. Nije potreban nikakav specifični mišji soj. Prosečna veličina legla soja je veća od osam i relativno je konstantna.

Koriste se zdrave i polno zrele životinje.

*1.6.1.3. Broj životinja*

Potreban broj životinja zavisi od učestalosti spontanih translokacija i najnižeg stepena indukcije potrebne za pozitivan rezultat.

Ispitivanje se obično obavlja analizom muškog F1 potomstva. Po svakoj doziranoj grupi potrebno je ispitati najmanje 500 muških F1 potomaka. Ukoliko je u ispitivanje uključeno i žensko F1 potomstvo, potrebno je 300 mužjaka i 300 ženki.

*1.6.1.4. Primena pozitivnih i negativnih kontrola*

Potrebni su odgovarajući kontrolni podaci dobijeni na osnovu istovremene kontrole i kontrole iz prošlih ispitivanja. Kad postoje prihvatljivi rezultati pozitivne kontrole iz nedavno izvedenih ispitivanja u istoj laboratoriji, mogu se upotrebiti ovi rezultati umesto istovremene pozitivne kontrole.

*1.6.1.5. Dozni nivoi*

Ispituje se jedna doza, obično najviša doza koja je u vezi sa izazivanjem minimalnih toksičnih efekata, ali bez uticaja na reproduktivno ponašanje ili preživljavanje. Kako bi se uspostavio odnos između doze i efekta, potrebne su i dve dodatne niže doze. Kod netoksičnih hemikalija potrebno je izlaganje maksimalnoj mogućoj dozi.

**1.6.2. Postupak**

*1.6.2.1. Tretiranje i parenje*

Postoje dva plana tretiranja. Najviše se koristi pojedinačna primena ispitivane supstance. Ispitivana supstanca se može primenjivati sedam dana nedeljno tokom perioda od 35 dana. Broj parenja koji sledi posle tretmana određen je planom tretmana. Obezbeđuje se obavljanje uzorkovanja u svim tretiranim stadijumima polnih ćelija. Na kraju perioda parenja ženke se pojedinačno stavljaju u kaveze. Kada se ženke okote, beleži se datum, veličina legla i pol potomstva. Svi muški potomci se odbijaju od sise, dok se svi ženski potomci odbacuju, osim ukoliko su obuhvaćeni ispitivanjem.

*1.6.2.2. Ispitivanje heterozigotnosti kod translokacije*

Koristi se jedna od dve moguće metode:

a) Ispitivanje plodnosti F1 potomstva i naknadna verifikacija mogućih nosilaca translokacije citogenetskom analizom;

b) Citogenetska analiza svih muških F1 potomaka bez prethodne selekcije na osnovu ispitivanja plodnosti.

a) Ispitivanje plodnosti

Smanjena plodnost F1 jedinki može se utvrditi praćenjem veličine legla i/ili analizom materičnog sadržaja ženskih ispitanika.

Neophodno je utvrditi kriterijume za određivanje normalne i smanjene plodnosti za soj miševa koji se koristi.

Praćenje veličine legla: F1 mužjaci, na kojima će biti izvedeno ispitivanje, pojedinačno se zatvaraju u kaveze zajedno sa ženkama iz istog eksperimenta ili iz kolonije. Kavezi se svakodnevno proveravaju, počevši 18 dana posle parenja. Prilikom okota beleži se veličina legla i pol F2 potomstva i legla se posle toga odbacuju. Ukoliko se ispituje žensko F1 potomstvo, F2 potomstvo iz malih legala zadržava se zbog daljih ispitivanja. Ženski nosioci translokacija proveravaju se citogenetskom analizom translokacije kod svakog od njihovih muških potomaka. XO-ženke prepoznaju se po promeni odnosa među polovima njihovog potomstva iz 1:1 u 1:2 u korist potomaka muškoga pola. U sekvencijalnom postupku normalne F1 životinje eliminišu se iz daljeg ispitivanja ukoliko prvo F2 leglo dostigne ili premaši unapred određenu normalnu vrednost. U suprotnom, obavlja se posmatranje drugog ili trećeg F2 legla.

F1 životinje koje se ne mogu klasifikovati kao normalne posle praćenja maksimalno tri F2 legla, ili se dalje ispituju analizom materičnog sadržaja ženskih ispitanika ili se direktno podvrgavaju citogenetskoj analizi.

Analiza materičnog sadržaja: do smanjenja veličine legla nosilaca translokacije dolazi zbog smrti embriona tako da visok broj mrtvih implantata upućuje na postojanje translokacije kod životinje koja se ispituje. Svaki F1 mužjak na kojem se obavlja ispitivanje pari se sa dve do tri ženke. Začeće se utvrđuje na osnovu svakodnevnih provera na postojanje vaginalnih "čepova" u jutarnjim satima. Ženke se lišavaju života na human način 14 do 16 dana kasnije i registruju se živi i mrtvi implantati u njihovim matericama.

b) Citogenetska analiza

Preparati sadržaja testisa pripremaju se tehnikom vazdušnog sušenja. Nosioci translokacija prepoznaju se po postojanju multivalentnih struktura pri dijakinezi - metafazi 1 u primarnim spermatocitima. Opažanje najmanje dve ćelije sa multivalentnom asocijacijom dovoljan je dokaz da je ispitana životinja nosilac translokacije.

Ukoliko nije obavljena ni jedna selekcija tokom uzgoja, svi F1 mužjaci se proveravaju citogenetski. Neophodno je mikroskopski otkriti postojanje najmanje 25 ćelija u metafazi 1 dijakineze po mužjaku. Neophodan je pregled mitotskih metafaza u spermatogonijima ili koštanoj srži F1 mužjaka s malim testisima i mejotskom razgradnjom pre dijakineze ili F1 ženki za koje se sumnja da su XO. Postojanje neobično dugog i/ili kratkog hromozoma u svakoj od deset ćelija dokaz je posebne translokacije kod mužjaka koja izaziva sterilnost (c-t tip). Neke translokacije autozoma X koje uzrokuju sterilnost mužjaka mogu se prepoznati samo analizom koja primenjuje pruganje mitotskih hromozoma.

Postojanje 39 hromozoma u svih 10 mitoza dokaz je postojanja XO stanja kod ženke.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno.

Za svaki period parenja, posle parenja roditelja, registruje se srednja veličina legla i odnos polova prilikom okota i prestanka dojenja.

Za procenu plodnosti F1 životinja navodi se srednja veličina legla svih normalnih parenja i pojedinačne veličine legla F1 nosilaca translokacija. Za analizu materičnog sadržaja izveštava se o prosečnom broju živih i mrtvih implantata posle normalnih parenja i o pojedinačnim brojevima živih i mrtvih implantata za svako parenje F1 nosilaca translokacije.

Za citogenetsku analizu dijakineze-metafaze 1 beleži se broj vrsta multivalentnih struktura i ukupan broj ćelija za svakog nosioca translokacije.

Za sterilne F1 jedinke beleži se ukupan broj parenja i trajanje perioda parenja. Navodi se masa testisa i detalji citogenetske analize.

Za XO ženke beleži se srednja veličina legla, odnos polova F1 potomstva i rezultati citogenetske analize.

Kad je moguće, F1 nosioci translokacije prethodno se biraju na osnovu ispitivanja plodnosti i tabele obuhvataju podatke o tome koliki broj njih su potvrđeni heterozigoti translokacije.

Navode se i podaci negativnih i pozitivnih kontrola ispitivanja.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- mišjem soju, starosti životinja, masi tretiranih životinja;

- broju životinja roditelja svakog pola u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;

- uslovima ispitivanja, detaljan opis tretmana, nivoa doza, rastvarača, raspored parenja;

- broju i polu potomaka po svakoj ženki, broju i polu potomaka uzgojenih u svrhu analize translokacije;

- vremenu i kriterijumima analize translokacije;

- broju i detaljnom opisu nosilaca translokacije, uključujući podatke o parenju i podatke o materičnom sadržaju, u zavisnosti od konkretnog slučaja;

- citogenetskim postupcima i detaljima mikroskopske analize, po mogućstvu uz slike;

- statističkoj proceni;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenje rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.26. SUBHRONIČNA ORALNA TOKSIČNOST PONOVLJENIH DOZA - STUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI NA GLODARIMA, 90 DANA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda ispitivanja subhronične oralne toksičnosti zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 408 (1998).

*1.1. UVOD*

Prilikom vrednovanja i procene toksičnih svojstava hemikalije subhronična oralna toksičnost može da se odredi primenom ponovljenih doza, a nakon što su, na osnovu 28-dnevnih ispitivanja toksičnosti, primenom akutne ili ponovljenih doza, dobijeni početni podaci o toksičnosti. Devedesetodnevno ispitivanje daje podatke o mogućim opasnostima po zdravlje koje će verovatno proizaći iz ponavljane dugotrajne izloženosti tokom perioda sazrevanja posle prestanka dojenja i perioda rasta, poprilično zahvatajući odraslo doba. Ispitivanje daje podatke o značajnijim toksičnim efektima, naznačava ciljne organe i mogućnost kumulacije, i može da obezbedi procenu nivoa ekspozicije pri kojem nisu primećeni neželjeni efekti, a koji se može primeniti prilikom izbora nivoa doze za hronična ispitivanja, kao i za utvrđivanje kriterijuma sigurnosti kod izlaganja ljudi.

Metoda stavlja dodatni akcenat na neurološke krajnje tačke i ukazuje na imunološke i reproduktivne efekte. Naglašava se i potreba za pažljivim kliničkim praćenjem životinja, s ciljem prikupljanja što veće količine podataka. Ovo ispitivanje omogućava prepoznavanje hemikalija koje imaju potencijal uzrokovanja neurotoksičnih i imunoloških efekata, kao i efekata na reproduktivnim organima, što može opravdati dalja detaljna istraživanja.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Doza jeste količina ispitivane supstance koja se primenjuje. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici telesne mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili u obliku konstantnih koncentracija izlaganja putem ishrane (ppm).

Doziranje jeste opšti pojam koji obuhvata dozu, njenu učestalost i vremensko trajanje doziranja.

NOAEL jeste skraćenica za nivo pri kojem nisu primećeni neželjeni efekti i predstavlja najviši nivo doze pri kojoj nisu primećeni nikakvi štetni nalazi vezani za tretman.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se svakodnevno oralnim putem u rastućim dozama kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja i to po jedan dozni nivo po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primene, životinje se pažljivo posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu lišene života na human način tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po završetku ispitivanja, preživele životinje takođe lišavaju života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Priprema životinja**

Prilikom ispitivanja neophodno je koristiti zdrave životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijske uslove najmanje pet dana i nisu bile predmet prethodnih eksperimentalnih postupaka. Eksperimentalne životinje potrebno je okarakterisati kao vrstu, soj, poreklo, pol, telesnu masu i/ili starost. Životinje se slučajnim izborom dodeljuju kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju. Kavezi su razmešteni na način kojim će mogući efekti koji proizlaze iz položaja kaveza biti svedeni na najmanju moguću meru. Svakoj životinji dodeljuje se jedinstveni identifikacioni broj.

**1.4.2. Priprema doza**

Ispitivana supstanca daje se putem intubacione cevi ili putem hrane ili vode za piće. Metoda oralne primene zavisi od svrhe ispitivanja, kao i od fizičkih i hemijskih svojstava ispitivanog materijala.

Kada je potrebno, ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje se da se, kad god je moguće, uzme u obzir primena vodenog rastvora/suspenzije, posle čega se razmatra rastvor/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje), a tek posle toga moguće je rastvaranje u ostalim vehikulumima. Za sve vehikulume, osim vode, moraju biti poznata toksična svojstva. Neophodno je utvrditi stabilnost ispitivane supstance u uslovima primene.

**1.4.3. Uslovi ispitivanja**

*1.4.3.1. Eksperimentalne životinje*

Najpogodnija životinjska vrsta je pacov, iako se mogu primeniti i ostale vrste glodara, na primer miševa. Koriste se mlade zdrave odrasle životinje laboratorijskih sojeva koji se obično upotrebljavaju. Biraju se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Sa doziranjem se započinje što je pre moguće posle prestanka dojenja, a pre nego što životinje navrše devet nedelja. Prilikom započinjanja ispitivanja, odstupanje u telesnoj masi životinja koje se koriste treba da bude minimalno i ne sme da odstupa više od ± 20% prosečne telesne mase svakog pola. Kada se istraživanje obavlja kao preliminarno, pre dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, u oba ispitivanja se upotrebljavaju životinje koje su istog soja i istog porekla.

*1.4.3.2. Broj i pol*

Prilikom ispitivanja svake doze upotrebljava se najmanje 20 životinja (deset ženki i deset mužjaka). Ukoliko se planira lišavanje života na human način u međuvremenu, broj je potrebno povećati za broj životinja čije se lišavanje života planira pre završetka ispitivanja. Na osnovu prethodnog znanja o hemikaliji ili bliskom analogu, potrebno je razmotriti uključivanje dodatne prateće grupe od deset životinja (pet po polu) u kontrolnu grupu i grupu koja prima najvišu dozu, zbog praćenja reverzibilnosti ili postojanosti bilo kog od toksičnih efekata po isteku perioda tretiranja. Trajanje ovog perioda posle tretiranja utvrđuje se u skladu sa zapaženim efektima.

*1.4.3.3. Nivoi doziranja*

Potrebno je koristiti najmanje tri nivoa doze i istovremenu kontrolu, osim u slučajevima u kojima se obavlja ispitivanje granične doze (videti odeljak 1.4.3.4. ove metode). Nivoi doze mogu da se temelje na rezultatima ispitivanja s ponovljenim doziranjem ili rezultatima ispitivanja namenjenog utvrđivanju raspona. Uzimaju se u obzir svi postojeći toksikološki i toksikokinetički podaci koji postoje za ispitivanu supstancu ili materijal s njom u vezi. Najviša doza bira se sa ciljem da izazove toksičnost, ali ne i smrt ili ozbiljne tegobe, osim ukoliko nije ograničena fizičkim i hemijskim karakteristikama ili biološkim efektima ispitivane supstance. Opadajući niz doza bira se s ciljem da se dokažu bilo kakve reakcije povezane s doziranjem, kao i najviši nivo na kome nisu primećeni neželjeni efekti (u daljem tekstu: NOAEL) pri najnižem nivou doze. Za uspostavljanje silaznih nivoa doza najčešće su optimalni dvostruki intervali, pa sve do četvorostrukih, dok je dodavanje četvrte eksperimentalne grupe preporučljivije od korišćenja vrlo velikih intervala između doziranja

Kontrolna grupa je ona koja se ne tretira ili kontrolna grupa koja se tretira samo vehikulumom ukoliko se isti koristi prilikom davanja ispitivane supstance. Izuzev tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupa se na isti način kao i sa eksperimentalnim grupama. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa prima vehikulum u najvišoj zapremini koja se primenjuje. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno sa hranom i uzrokuje smanjen unos hrane tada se, za razlikovanje smanjenog unosa uzrokovanog ukusom i onog usled toksikoloških promena kod eksperimentalnog modela, koristi paralelno hranjena kontrolna grupa.

U obzir se uzimaju sledeća svojstva vehikuluma i ostalih dodataka, u zavisnosti od slučaja: efekti na apsorpciju, raspodelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; efekta na hemijska svojstva ispitivane supstance koji mogu promeniti njena toksična svojstva i efekti na potrošnju hrane i vode ili stanje uhranjenosti životinja.

*1.4.3.4. Ispitivanje granične doze*

Ukoliko zbog eksperimenta s jednim nivoom doze, koja je najmanje jednaka 1.000 mg/kg TM/dnevno, a koji se koristi u postupcima opisanim za ovo ispitivanje, ne nastanu nikakvi primetni neželjeni efekti i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, tada se ne smatra neophodnim celokupno ispitivanje koje primenjuje tri nivoa doziranja. Ispitivanje granične doze nije primenljiv u slučajevima kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primenom višeg nivoa doze.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Primena doza**

Životinjama se ispitivana supstanca daje svakodnevno, sedam dana nedeljno tokom perioda od 90 dana. Bilo koji drugi režim doziranja, na primer, pet dana nedeljno, potrebno je opravdati. Kada se ispitivana supstanca primenjuje putem intubacijske cevi (prisilno hranjenje), istu je potrebno dati u obliku jedne doze životinjama koje koriste želudačnu cev ili odgovarajuću intubacijsku kanilu. Maksimalna zapremina tečnosti koja es može dati odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme da bude veća od 1ml/100g TM, osim u slučaju vodenih rastvora kada je moguće primeniti 2 ml/100g TM. Izuzev u slučaju iritativnih ili korozivnih supstanci kod kojih se nepovoljni efekti obično pokazuju pri višim koncentracijama, varijabilnost eksperimentalne zapremine je svedena na najmanju moguću meru prilagođavanjem koncentracije, a kako bi se osigurala konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

Kod supstanci koje se primenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane supstance o kojoj je reč ne ometaju redovnu ishranu i ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca daje putem hrane, može da se primeni konstantna prehrambena koncentracija (ppm) ili konstantni dozni nivo u odnosu na telesnu masu životinje. Alternativa koja se koristi se naznačava. U slučaju supstance koja se daje prisilnim hranjenjem (intubacijskom cevi), dozu je potrebno dati svaki dan u isto vreme i po potrebi prilagoditi kako bi se održala konstantna doza u odnosu na telesnu masu životinje. Kada se 90-dnevno ispitivanje koristi kao preliminarno ispitivanje dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, preporučljivo je u oba ispitivanja primeniti sličan način ishrane.

**1.5.2. Posmatranja**

Praćenje traje najmanje 90 dana. Životinje u pratećoj grupi za koje se planiraju dodatna posmatranja potrebno je, odgovarajuće vreme, držati bez tretmana, a kako bi se otkrila postojanost ili oporavak od toksičnih efekata.

Opšta klinička posmatranja obavljaju se najmanje jednom dnevno, najbolje u isto vreme svakog dana, uzimajući u obzir najznačajniji period očekivanih efekata posle doziranja. Neophodno je zabeležiti kliničko stanje životinja. Najmanje dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje se proveravaju na simptome morbiditeta i mortaliteta.

Najmanje jednom pre prvog izlaganja (kako bi se omogućilo poređenje kod istih ispitanika) i jednom nedeljno posle toga, potrebno je detaljno kliničko snimanje stanja svih životinja. Navedena posmatranja potrebno je obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom okruženju i svaki put u slično vreme. Posmatranja se pažljivo registruju, najbolje korišćenjem sistema vrednovanja, izričito definisanih od strane laboratorije koja obavlja ispitivanje. Neophodno je uložiti određeni napor kako bi se obezbedilo da su odstupanja u uslovima posmatranja minimalna. Simptomi koji se beleže obuhvataju, ali nisu ograničeni na, promene na koži, krznu, očima, mukoznim membranama, pojavi sekreta ili ekskreta i autonomnu aktivnost (npr. suzenje, piloerekcija, veličina zenica, neobična respiratorna struktura). Registruju se i promene u hodu, držanju i reakciji na manipulisanje, kao i postojanje kloničkih ili toničkih pokreta, šablone u ponašanju (npr. preterano negovanje spoljašnosti, ponovljeno kruženje) ili neobično ponašanje (npr. samoozleđivanje, hodanje unatrag)**1**.

Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili podjednako odgovarajuće opreme, potrebno je obaviti pre primene ispitivane supstance i po završetku ispitivanja, najbolje kod svih životinja, ali najmanje u grupama koje primaju visoku dozu i kontrolnim grupama. Ukoliko se primete promene na očima, neophodan je pregled svih životinja.

Pri kraju perioda izlaganja, a u svakom slučaju ne ranije od jedanaeste nedelje, obavlja se ocena senzorne reaktivnosti na podražaje različitih vrsta**1** (npr. zvučne, vizuelne i proprioceptivne podražaje)**2, 3, 4**, ocenu jačine stiska**5** i ocenu motorne aktivnosti**6**. Dalje pojedinosti o postupcima navedene su u literaturi. Mogu se primeniti i alternativni postupci različiti od onih iz literature.

Mogu se izostaviti funkcionalna posmatranja koja se obavljaju pri kraju ispitivanja kad postoje podaci o funkcionalnim posmatranjima iz drugih istraživanja, a dnevna klinička posmatranja nisu otkrila nikakve funkcionalne nedostatke.

Izuzetno, funkcionalna posmatranja mogu se izostaviti i kod grupa koje na drugi način pokazuju simptome toksičnosti do mere koja bi znatno ometala obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

*1.5.2.1. Telesna masa i potrošnja hrane/vode*

Sve životinje se mere najmanje jednom nedeljno. Merenje potrošnje hrane potrebno je obavljati najmanje jednom nedeljno. Ukoliko se ispitivana supstanca daje putem vode za piće, meri se i potrošnja vode, i to najmanje na nedeljnom nivou. Potrošnja vode može se razmatrati i u ispitivanjima koja se odnose na ishranu ili prisilno hranjenje tokom kojih može doći do promene u aktivnosti uzimanja tečnosti.

*1.5.2.2. Hematologija i medicinska biohemija*

Uzorke krvi potrebno je uzeti s navedenog izvora i čuvati pod odgovarajućim uslovima, u zavisnosti od konkretnog slučaja. Na kraju perioda ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno pre ili u okviru postupka lišavanja životinja života na human način.

Na kraju perioda ispitivanja, i uvek kada su u međuvremenu prikupljeni bilo kakvi uzorci krvi, neophodno je obaviti sledeća hematološka ispitivanja: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i određivanje vremena/potencijala zgrušavanja krvi.

Medicinsko-biohemijska određivanja koja se izvode u cilju istraživanja značajnijih toksičnih efekata u tkivima, odnosno u cilju istraživanja efekata na bubrege i jetru, potrebno je obaviti na uzorcima krvi svake životinje neposredno pre lišavanja života na human način ili u okviru postupka lišavanja života životinja (osim kod životinja koje su umirale i/ili su lišene života na human način). Slično hematološkim ispitivanjima, može se obaviti uzorkovanje u međuvremenu i u svrhu medicinsko-biohemijskih ispitivanja. Preporučuje se uskraćivanje hrane životinjama tokom noći pre uzimanja uzoraka krvi.**II** Određivanja u plazmi ili serumu obuhvataju: natrijum, kalijum, glukozu, ukupni holesterol, ureu, azot iz uree u krvi (u daljem tekstu: BUN), kreatinin, ukupne proteine i albumin i više od dva enzima indikatora hepatocelularnih efekata (poput alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transpeptidaze i sorbitol dehidrogenaze). Mogu se obaviti i merenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog porekla) i žučnih kiselina, a koji, pod određenim okolnostima, mogu dati korisne podatke.

Opciono, tokom poslednje nedelje ispitivanja prikupljanjem zapremine urina u ograničenom vremenskom periodu mogu se obaviti sledeća određivanja u okviru analize urina: izgled, volumen, osmolalnost ili specifična težina, pH, proteini, glukoza i krv/krvne ćelije. Potrebno je razmotriti i ispitivanja serumskih markera opštih oštećenja tkiva. Ostala određivanja koja je potrebno obaviti, ukoliko su poznata svojstva ispitivane supstance ili postoji sumnja da utiču na srodne metaboličke profile, obuhvataju kalcijum, fosfor, vrednost triglicerida na prazan želudac, specifične hormone, methemoglobin i holinesteraze. Navedeno je potrebno identifikovati kod hemikalija koje pripadaju određenim kategorijama ili u zavisnosti od slučaja.

Potreban je fleksibilan pristup u zavisnosti od životinjske vrste i primećenih odnosno očekivanih efekata ispitivane supstance.

Ukoliko osnovni podaci ranijih studija ne odgovaraju, razmatra se potreba za utvrđivanjem hematoloških i kliničko biohemijskih parametara pre početka doziranja. Ne preporučuje se utvrđivanje ovih podataka pre tretmana**7**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**II** Kod niza merenja u serumu i plazmi, posebno u slučaju glukoze, preporučuje se uskraćivanje hrane tokom noći. Glavni razlog je činjenica da povećana varijabilnost, koja neizbežno nastaje kao posledica uzimanja hrane, može prikriti nešto suptilnije efekte i otežati tumačenje. S druge strane, gladovanje tokom noći može ometati opšti metabolizam životinja i, posebno u studijama koje se bave ishranom, narušiti dnevno izlaganje ispitivanoj supstanci. Ukoliko se usvoji gladovanje tokom noći, medicinsko-biohemijska ispitivanja izvode se posle obavljanja funkcionalnih ispitivanja.

*1.5.2.3. Postmortalni pregled (postmortalni pregled)*

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pažljiv pregled spoljne površine tela, svih telesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Sa jetre, bubrega, nadbubrežne žlezde, testisa, epididimisa, uterusa, ovarijuma, grudne žlezde, slezine, mozga i srca svake životinje (osim životinja koje su zatečene na samrti i/ili su interkurentno lišene života na human način) potrebno je odstraniti sva pripadajuća tkiva, zavisno od slučaja, i izmeriti njihovu masu u vlažnom stanju što je pre moguće posle disekcije kako bi se izbeglo isušivanje.

U medijumu za fiksaciju koji je najpogodniji s obzirom na vrstu tkiva i histopatološko ispitivanje koje sledi potrebno je sačuvati sledeća tkiva: sve makro lezije, mozak (reprezentativna područja, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), kičmenu moždinu (na tri nivoa: cervikalnoj regiji, sredini torakalne regije i lumbalnoj regiji), hipofizu, štitnu žlezdu, paratiroidnu žlezdu, grudnu žlezdu, jednjak, pljuvačne žlezde, želudac, tanko i debelo crevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, gušteraču, bubrege, nadbubrežne žlezde, slezinu, srce, dušnik i pluća (očuvana naduvavanjem fiksirom i zatim uranjanjem), aortu, polne žlezde, uterus, pomoćne polne organe, ženske mlečne žlezde, prostatu, mokraćnu bešiku, žučnu bešiku (miš), limfne žlezde (najbolje jedna limfna žlezda koja pokriva put kojim se supstanca primenjuje i druga koja je udaljena od puta kojim se supstanca primenjuje kako bi se obuhvatili sistemski efekti), periferne nerve (ishijatični ili tibijalni nerv) najbolje u blizini mišića, uzorak koštane srži (i/ili sveži aspirat koštane srži), kožu i oči (ukoliko su na njima primećene promene tokom oftalmoloških pregleda). Klinički i ostali nalazi mogu da ukažu na potrebu ispitivanja dodatnih tkiva. Potrebno je sačuvati i sve organe za koje postoji verovatnoća da su ciljni organi, a na osnovu poznatih svojstava ispitivane supstance.

*1.5.2.4. Histopatologija*

Potrebno je obaviti celovitu histopatologiju na sačuvanim organima i tkivima svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su primale visoke doze. Navedenim ispitivanjima obuhvataju se životinje svih ostalih grupa doziranja, ukoliko su kod grupe koja je primala visoku dozu primećene promene vezane za tretman.

Neophodno je ispitati sve veće lezije.

Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima na kojima je primećeno ispoljavanje efekata u tretiranim grupama.

**2. PODACI**

Podaci se navode pojedinačno, tabelarno, tako što se navode: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj ispitivanoj grupi, broj životinja koje su pronađene mrtve tokom ispitivanja ili su lišene života iz humanih razloga, kao i vreme svake smrti ili lišavanja života na human način, broj životinja kod kojih su se pojavili simptomi toksičnosti, opis primećenih simptoma toksičnosti, uključujući vreme njihovog nastupanja, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog efekta, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i procent životinja kod kojih se pojavila svaka vrsta lezija.

Kada odgovara, numerički rezultati se procenjuju pomoću odgovarajuće i opšteprihvaćene statističke metode. Statističke metode i podaci koji se analiziraju biraju se tokom osmišljavanja ispitivanja.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, čistoća i fizička i hemijska svojstva;

- podaci za identifikaciju;

- vehikulum (ukoliko odgovara): razlozi za izbor vehikuluma, ukoliko nije reč o vodi.

2) Vrsti životinja koje se ispituju:

- upotrebljena vrsta i soj;

- broj, starost i pol životinja;

- poreklo, uslovi smeštaja, ishrana, itd.;

- pojedinačna telesna masa životinja na početku ispitivanja.

3) Uslovima ispitivanja:

- logička osnova za izbor nivoa doza;

- detalji o pripremanju ispitivane supstance/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;

- detalji o načinu primene ispitivane supstance na životinjama;

- stvarne doze (mg/kg TM/dnevno) i faktor preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, ukoliko je primenljivo na konkretan slučaj;

- detalji o kvalitetu hrane i vode.

4) Rezultatima:

- telesna masa i promene u telesnoj masi;

- potrošnja hrane i vode, ako je merodavno;

- podaci o toksičnoj reakciji po polu i nivou doze, uključujući simptome toksičnosti;

- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo u slučaju prolaznih, bilo neprolaznih efekata);

- rezultati oftalmološkog pregleda;

- ocene senzorne aktivnosti, jačine stiska i motornih aktivnosti (kad je moguće);

- hematološka ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrednostima;

- medicinsko biohemijska ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrednostima;

- telesna masa po lišavanju života na human način, masa organa i odnos mase organa/TM;

- obdukcioni nalazi;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- podaci o apsorpciji ukoliko postoje;

- statistička obrada rezultata, kada odgovara.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

2. Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta N eurobiol. Exp., 40, 999-1003.

3. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

4. Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

5. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

6. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 59 9-609.

7. Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

**B.27. SUBHRONIČNA ORALNA TOKSIČNOST PONOVLJENIH DOZA - STUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI NA NE-GLODARIMA, 90 DANA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda ispitivanja subhronične oralne toksičnosti zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 409 (1998).

*1.1. UVOD*

Prilikom vrednovanja i ocene toksičnih svojstava hemikalije mogu se odrediti subhronične oralne toksičnosti primenom ponovljenih doza, a nakon što su, na osnovu 28-dnevnih ispitivanja toksičnosti, primenom akutne ili ponovljenih doza, dobijeni početni podaci o toksičnosti. Devedesetodnevno ispitivanje daje podatke o mogućim opasnostima po zdravlje koje verovatno proizilaze iz ponavljane izloženosti tokom perioda ubrzanog rasta i ulaska u mlađe odraslo doba. Ispitivanje daje podatke o značajnijim toksičnim efektima, naznačava ciljne organe i mogućnost kumulacije, i može da pruži procenu nivoa ekspozicije pri kome nisu opaženi neželjeni efekti, a koji se može primeniti prilikom izbora nivoa doze za ispitivanja u kojima se primenjuju hronične doze, kao i prilikom utvrđivanja kriterijuma bezbednosti kod izlaganja ljudi.

Eksperimentalna metoda omogućava prepoznavanje štetnih efekata koji se javljaju kod vrsta koje nisu glodari prilikom izlaganja hemikalijama. Potrebno je ovu metodu koristiti isključivo:

- kad efekti primećeni u drugim ispitivanjima ukazuju na potrebu za razjašnjenjem/ karakterizacijom kod druge vrste koja ne pripada rodu glodara ili

- kada toksikokinetička ispitivanja pokazuju da je korišćenje specifične vrste ne-glodara najrelevantniji izbor laboratorijske životinje ili

- u slučajevima kad ostali specifični razlozi opravdavaju upotrebu određene vrste ne-glodara.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Doza jeste količina ispitivane supstance koja se primenjuje. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici telesne mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili u obliku konstantnih prehrambenih koncentracija (ppm).

Doziranje jeste opšti pojam koji obuhvata dozu, njenu učestalost i vremensko trajanje doziranja.

NOAEL jeste skraćenica za nivo na kojem nisu opaženi neželjeni efekti i predstavlja najviši nivo doze pri kojoj ne postoje nikakvi štetni nalazi vezani za tretman.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se dnevno oralnim putem i u progresivnim dozama kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, i to jedan dozni nivo po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primene životinje se pažljivo posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu lišene života na human način tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po zaključenju ispitivanja, preživele životinje takođe lišavaju života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Izbor životinjske vrste**

Najčešće korišćena vrsta ne-glodara je pas koji treba da bude određene pasmine. Često se koristi bigl (kratkonogi pas zečar). Ostale vrste, poput svinja i patuljastih svinja takođe se mogu koristiti. Korišćenje primata se ne preporučuje i njihova primena se opravdava. Neophodno je koristiti mlade zdrave životinje. U slučaju pasa s doziranjem je najbolje započeti pri starosti od 4 do 6 meseci i ne kasnije od 9 meseci starosti. Kad se istraživanje obavlja kao preliminarno, pre dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, u oba ispitivanja se upotrebljava ista vrsta/pasmina životinja.

**1.4.2. Priprema životinja**

Prilikom ispitivanja obavezno se koriste zdrave mlade životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijske uslove i koje nisu bile predmet prethodnih eksperimentalnih postupaka. Trajanje aklimatizacije zavisi od odabrane eksperimentalne životinjske vrste i njenog porekla. Preporučuje se aklimatizacija u trajanju od najmanje pet dana za pse ili svinje uzgojene u tu svrhu, a koje pripadaju koloniji životinja trajno smeštenoj na lokaciji ispitivanja, i najmanje dve nedelje za iste životinje ukoliko potiču iz spoljašnjih izvora. Eksperimentalne životinje se označavaju s obzirom na njihovu vrstu, soj, poreklo, pol, težinu i/ili starost. Životinje se nasumično dodeljuju kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju. Kavezi su razmešteni na način kojim će mogući efekti koji proizlaze iz položaja kaveza biti svedeni na najmanju moguću meru. Svakoj životinji se dodeljuje jedinstveni identifikacioni broj.

**1.4.3. Priprema doza**

Ispitivana supstanca se daje putem hrane ili vode za piće, prisilnim hranjenjem (putem intubacijske cevi) ili u obliku kapsula. Metoda oralne primene zavisi od svrhe ispitivanja, kao i od fizičkih i hemijskih svojstava ispitivane supstance.

Kada je potrebno, ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem medijumu. Preporučuje se da se, kad god je moguće, uzme u obzir primena vodenog rastvora/suspenzije, posle čega se razmatraju rastvori/emulzije u ulju (npr. kukuruzno ulje), a tek posle toga moguće rastvaranje u ostalim vehikulumima. Za sve vehikulume, osim vode, moraju biti poznata toksična svojstva. Neophodno je utvrditi stabilnost ispitivane supstance u uslovima primene.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Broj i pol životinja**

Prilikom ispitivanje svake doze upotrebljava se najmanje osam životinja (četiri ženke i četiri mužjaka). Ukoliko se u međuvremenu planira lišavanje života na human način, broj je potrebno povećati za broj životinja čije se lišavanje života planira pre zaključenja ispitivanja. Broj životinja na kraju ispitivanja odgovara za značajno vrednovanje toksičnih efekata. Na osnovu prethodnog znanja o supstanci ili njenom bliskom analogu, potrebno je uzeti u obzir uključivanje dodatne prateće grupe od osam životinja (četiri po polu) u kontrolnu grupu i grupu koja prima najvišu dozu, a zbog praćenja prolaznosti (reverzibilnosti) ili postojanosti bilo kog od toksičnih efekata po isteku perioda tretiranja. Trajanje ovoga perioda posle tretiranja utvrđuje se u skladu sa opaženim efektima.

**1.5.2. Doziranje**

Upotrebljava se najmanje tri nivoa doze i istovremena kontrola, osim u slučajevima kada se obavlja ispitivanje granične doze (videti odeljak 1.5.3. ove metode). Nivoi doze mogu se zasnivati na rezultatima ispitivanja s ponovljenom dozom ili na rezultatima ispitivanja namenjenog utvrđivanju raspona. Uzimaju se u obzir svi postojeći toksikološki i toksikokinetički podaci koji postoje za ispitivano jedinjenje ili srodne materije. Osim ukoliko nije ograničena fizičkom i hemijskom prirodom ili biološkim efektima ispitivane supstance, najviša doza se bira sa ciljem da izazove toksičnost, ali ne smrt ili ozbiljne tegobe. Opadajući niz doza bira se s namerom da se dokažu bilo kakve reakcije povezane sa doziranjem, kao i nivoa pri kome se ne opažaju neželjeni efekti (NOAEL) pri najnižoj dozi. Dvostruki intervali, pa sve do četvorostrukih, najčešće su optimalni za uspostavljanje silaznih doza, dok je dodavanje četvrte eksperimentalne grupe često preporučljivije od korišćenja vrlo velikih intervala između doziranja.

Kontrolna grupa je ona koja se ne tretira ili kontrolna grupa koja se tretira samo vehikulumom ukoliko se isti koristi prilikom davanja ispitivane supstance. Izuzev načina tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi potrebno je postupati na način kao i sa eksperimentalnim grupama. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvišoj količini koja se primenjuje. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno s hranom i uzrokuje smanjen unos hrane tada, u razlikovanju smanjenog unosa uzrokovanog ukusom ili toksikološkim promenama kod eksperimentalnog modela, može biti od koristi paralelno hranjena kontrolna grupa.

Uzimaju se u obzir sledeća svojstva vehikuluma i ostalih dodataka, u zavisnosti od slučaja: delovanje na apsorpciju, raspodelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; dejstvo na hemijska svojstva ispitivane supstance koje može promeniti njena toksična svojstva i delovanje na potrošnju hrane i vode ili stanje uhranjenosti životinja.

**1.5.3. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko prilikom ispitivanja sa jednim nivoom doze, koja je najmanje jednaka nivou od 1.000 mg/kg TM/dnevno, u eksperimentu u kome se koriste postupci opisani za ovo ispitivanje, ne nastanu nikakvi štetni efekti i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno srodnim supstancama, ne smatra se neophodnim celokupno ispitivanje koje primenjuje tri nivoa doziranja. Ispitivanje granične doze se ne primenjuje samo u slučajevima kada izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primenom veće doze.

**1.5.4. Primena doza**

Ispitivana supstanca se životinjama daje svakodnevno, sedam dana nedeljno tokom perioda od 90 dana. Bilo koji drugi režim doziranja, na primer, pet dana nedeljno, potrebno je opravdati. Kada se ispitivana supstanca primenjuje putem intubacijske cevi (prisilno hranjenje), životinjama koje koriste želudačnu cev ili odgovarajuću intubacionu kanilu, potrebno je dati u obliku jedne doze. Maksimalna zapremina tečnosti koja se može dati odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Neophodno je držati zapreminu na najnižem mogućem nivou. Izuzev u slučaju iritabilnih ili korozivnih supstanci kod kojih se obično lošiji efekti pokazuju pri višim koncentracijama, varijabilnost eksperimentalne zapremine se svodi na najmanju moguću meru prilagođavanjem koncentracije, a kako bi se osigurala konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

Kod supstance koje se daju putem hrane ili vode za piće važno je obezbediti da količine ispitivane supstance o kojoj je reč ne ometaju redovnu ishranu i ravnotežu vode. Kad se ispitivana supstanca primenjuje hranom, može se primeniti konstantna prehrambena koncentracija (ppm) ili konstantna doza u odnosu na telesnu masu životinje. Alternativa koja se koristi se označava. U slučaju supstance koja se daje prisilnim hranjenjem (intubacijskom cevi) ili u obliku kapsula, dozu je potrebno dati svaki dan u isto vreme i po potrebi prilagoditi kako bi se održala konstantna doza u odnosu na telesnu masu životinje. Kad se 90-dnevno ispitivanje koristi kao preliminarno ispitivanje dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, preporučljivo je u oba ispitivanja primeniti sličan način ishrane.

**1.5.5. Opažanja**

Posmatranje traje najmanje 90 dana. Životinje u pratećoj grupi za koje se planiraju dodatna praćenja potrebno je, odgovarajuće vreme, držati bez tretmana, a kako bi se otkrila postojanost ili oporavak od toksičnih efekata.

Opšti klinički pregled se obavlja najmanje jednom dnevno, najbolje u isto vreme svakog dana, uzimajući u obzir najznačajniji period u kome se očekuje pojava efekata posle doziranja. Neophodno je zabeležiti kliničko stanje životinja. Najmanje dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje se proveravaju na simptome morbiditeta i mortaliteta.

Najmanje jednom pre prvog izlaganja (kako bi se omogućilo poređenje kod istih ispitanika) i jednom nedeljno posle toga, potrebno je detaljno kliničko praćenje stanja svih životinja. Navedena opažanja, kad je to praktično, potrebno je obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom okruženju i svaki put u slično vreme. Neophodno je uložiti određeni napor kako bi se garantovalo da su odstupanja u uslovima posmatranja minimalna. Simptomi toksičnosti pažljivo se registruju, uključujući vreme njihovog nastupanja, stepen i trajanje. Opažanja obuhvataju, ali nisu ograničena na: promene na koži, krznu, očima, mukoznim membranama, nastanak sekrecija i izlučevina i autonomnu aktivnost (npr. suzenje, piloerekcija - podizanje dlake, veličina zenica, neobična respiratorna struktura). Potrebno je registrovati i promene u hodu, držanju i reakciji na manipulisanje, kao i postojanje kloničkih ili toničkih pokreta i šablona u ponašanju (npr. preterano negovanje spoljašnosti, ponovljeno kruženje) ili neobično ponašanje.

Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili odgovarajuće opreme, obavlja se pre davanja ispitivane supstance i posle završetka ispitivanja, najbolje kod svih životinja ili bar u grupama koje primaju visoku dozu i u kontrolnim grupama. Ukoliko se primete promene na očima, neophodan je pregled svih životinja.

*1.5.5.1. Telesna masa i potrošnja hrane/vode*

Sve životinje se mere najmanje jednom nedeljno. Merenje potrošnje hrane obavlja se najmanje jednom nedeljno. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno sa vodom za piće, meri se i potrošnja vode, i to najmanje na nedeljnom nivou. Potrošnja vode može da se uzme u obzir i u ispitivanjima koja se odnose na ishranu ili prisilno hranjenje tokom kojih može doći do promene u aktivnosti uzimanja tečnosti.

*1.5.5.2. Hematologija i medicinska biohemija*

Uzorke krvi potrebno je uzeti sa navedenog mesta i čuvati u odgovarajućim uslovima, u zavisnosti od konkretnog slučaja. Na kraju perioda ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno pre ili prilikom postupka lišavanja životinja života na human način.

Na početku ispitivanja, zatim u mesečnim intervalima ili na sredini ispitivanja i na kraju ispitivanja, obavezno je hematološko ispitivanje, uključujući, hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i merenje potencijala zgrušavanja, poput vremena zgrušavanja, protrombinskog vremena ili tromboplastinskog vremena.

Određivanja iz područja medicinske biohemije s ciljem istraživanja značajnijih toksičnih efekata u tkivima, odnosno efekta na bubrege i jetru, potrebno je obaviti na uzorcima krvi dobijenim od svake životinje na početku, zatim u mesečnim intervalima ili na sredini ispitivanja i na kraju ispitivanja. Područja ispitivanja koja je potrebno uzeti u obzir obuhvataju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata i funkciju jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču zapažanja o načinu delovanja ispitivane supstance. Preporučuje se gladovanje kod životinja pre uzimanja uzoraka krvi tokom vremenskog perioda koje odgovara pojedinoj životinjskoj vrsti. Preporučena određivanja obuhvataju utvrđivanje: nivoa kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, vrednosti glukoze na prazan želudac, alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, ornitin dekarboksilaze, gama glutamil transpeptidaze, azota iz uree, albumina, kreatinina u krvi i merenje ukupnog bilirubina i ukupnih proteina u serumu.

Analize mokraće potrebno je izvesti najmanje na početku, zatim na sredini i na kraju ispitivanja, prikupljanjem zapremine mokraće u odgovarajućem vremenskom periodu. Analiza mokraće obuhvata izgled, volumen, osmolalnost i specifičnu težinu, pH, proteine, glukozu i krv/krvne ćelije. Mogu se primeniti i dodatni parametri u slučajevima kad je potrebno proširiti ispitivanje primećenih efekata.

Potrebno je razmotriti i ispitivanja namenjena istraživanju serumskih markera opštih tkivnih oštećenja. Ostala opažanja koja mogu biti potrebna zbog donošenja odgovarajuće toksikološke ocene obuhvataju: analizu lipida, hormona, acido-bazne ravnoteže, methemoglobina i inhibicije holinesteraze.

Dopušteno je dodatno koristiti analize medicinske biohemije kada je potrebno proširiti ispitivanje zapaženih efekata. Navedene efekte je potrebno identifikovati kod hemikalija koje pripadaju određenim kategorijama opasnosti ili u zavisnosti od konkretnog slučaja.

Potreban je fleksibilan pristup, u zavisnosti od životinjske vrste i zapaženih odnosno očekivanih efekata ispitivane supstance.

*1.5.5.3. Postmortalni pregled (makro-nekropsija)*

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pažljiv pregled spoljnje površine tela, svih telesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Sa jetre sa žučnom kesicom, bubrega, nadbubrežne žlezde, testisa, epididimisa, ovarijuma, uterusa, štitne žlezde (sa paratiroidnim žlezdama), grudne žlezde, slezine, mozga i srca svake životinje (osim životinja koje su zatečene na umiranju i/ili su lišene života na human način) potrebno je odstraniti sva pripadajuća tkiva, u zavisnosti od slučaja, izmeriti njihovu težinu u vlažnom stanju što je pre moguće posle disekcije kako bi se izbeglo isušivanje.

U medijumu fiksacije koji je najprikladniji s obzirom na vrstu tkiva i histopatološko ispitivanje koje sledi potrebno je sačuvati sledeća tkiva: sve makro lezije, mozak (reprezentativna područja, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), kičmenu moždinu (na tri nivoa: cervikalnoj regiji, sredini torakalne regije i lumbalnoj regiji), hipofizu, oči, štitnu žlezdu, paratiroidnu žlezdu, grudnu žlezdu, jednjak, pljuvačne žlezde, želudac, tanko i debelo crevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, žučnu kesu, pankreas, bubrege, nadbubrežne žlezde, slezinu, srce, dušnik i pluća, aortu, polne žlezde, uterus, pomoćne polne organe, ženske mlečne žlezde, prostatu, mokraćnu bešiku, limfne žlezde (najbolje jedna limfna žlezda koja pokriva put primene supstance i druga koja je udaljena od puta kojim se supstanca primenjuje kako bi se njome obuhvatili sistemski efekti), periferne živce (ishijatični ili tibijalni živac) najbolje u blizini mišića, uzorak koštane srži (i/ili sveži aspirat koštane srži) i kožu. Klinički i ostali nalazi mogu da ukažu na potrebu ispitivanja dodatnih tkiva. Potrebno je sačuvati i sve organe za koje postoji verovatnoća da su ciljni organi, a na osnovu poznatih svojstava ispitivane supstance.

*1.5.5.4. Histopatologija*

Potrebno je obaviti celovitu histopatologiju na sačuvanim organima i tkivima, bar svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su primale visoke doze. Navedenim ispitivanjima obuhvataju se životinje svih ostalih grupa doziranja, a ukoliko kod grupe koja je primala visoku dozu budu primećene promene vezane za tretman.

Ispituju se sve makro-lezije.

Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima za koja je zaključeno da se na njima pokazuju efekti u tretiranim grupama.

**2. PODACI**

Neophodno je navesti podatke koji se odnose na pojedinačne životinje. Podaci se navode tabelarno i prikazuju: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj eksperimentalnoj grupi, broj životinja koje su pronađene mrtve tokom ispitivanja ili su lišene života iz humanih razloga, kao i vreme svake smrti ili lišavanja života na human način, broj životinja kod kojih su se pojavili simptomi toksičnosti, opis zapaženih simptoma toksičnosti, uključujući vreme njihovog nastupanja, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog efekta, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i procenat životinja kod kojih se pojavila svaka pojedina vrsta lezija.

Kada je moguće, numerički rezultati se procenjuju pomoću odgovarajuće i opšteprihvaćene statističke metode. Statističke metode i podaci koji se analiziraju biraju se tokom osmišljavanja ispitivanja.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, čistoća i fizička i hemijska svojstva;

- podaci za identifikaciju;

- vehikulum (ukoliko odgovara): razlozi za izbor vehikuluma, ukoliko nije reč o vodi.

2) Eksperimentalnoj životinjskoj vrsti:

- upotrebljena vrsta i soj;

- broj, starost i pol životinja;

- poreklo, uslovi smeštaja, ishrana, itd.;

- pojedinačna telesna masa životinja na početku ispitivanja.

3) Uslovima ispitivanja:

- logička osnova za izbor nivoa doze;

- detalji o pripremanju ispitivane supstance/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;

- detalji o načinu primene ispitivane supstance na životinjama;

- stvarne doze (mg/kg TM/dnevno) i faktor preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, ukoliko je primenljivo na konkretan slučaj;

- detalji o kvalitetu hrane i vode.

4) Rezultatima:

- telesna masa i promene u telesnoj masi;

- potrošnja hrane i vode, ako je bitno;

- podaci o toksičnom efektu po polu i nivou doze, uključujući simptome toksičnosti;

- svojstva, tačnost i trajanje kliničkih posmatranja (bilo u slučaju reverzibilnih, bilo ireverzibilnih efekata);

- oftalmološki pregled;

- hematološka ispitivanja s relevantnim osnovnim vrednostima;

- medicinsko-biohemijska ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrednostima;

- telesna masa po lišavanju života na human način, težine organa i odnosi težine organa/TM;

- obdukcioni nalazi;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- podaci o apsorpciji ukoliko postoje;

- statistička obrada rezultata, kada odgovara.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**B.28. SUBHRONIČNA DERMALNA TOKSIČNOST - STUDIJA PONOVLJENIH DERMALNIH DOZA NA GLODARIMA, 90 DANA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca se svakodnevno i u progresivnim dozama nanosi na kožu nekoliko grupa eksperimentalnih životinja i to jedna doza po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primene životinje se svakodnevno posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po zaključenju ispitivanja, preživele životinje takođe lišavaju života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Životinje se drže u uslovima eksperimentalnog smeštaja i ishrane tokom najmanje pet dana pre ispitivanja. Pre ispitivanja, zdrave i mlade životinje se slučajnim izborom biraju i dodeljuju tretiranim i kontrolnim grupama. S leđnog dela trupa eksperimentalnih životinja neposredno pre ispitivanja ošiša se krzno. Moguće je brijanje, ali je potrebno obaviti ga oko 24 sata pre ispitivanja. Šišanje ili brijanje obično je potrebno ponoviti svake nedelje. Prilikom šišanja ili brijanja krzna ne treba oštetiti kožu. Za primenu supstance koja se ispituje potrebno je ukloniti krzno s najmanje 10% površine tela. Prilikom odlučivanja o veličini površine tela sa koje je potrebno ukloniti krzno i o dimenzijama prekrivanja supstancom koja se ispituje uzima se u obzir telesna masa životinje. Kad se ispituju čvrste supstance, koje se, ukoliko odgovara, mogu i pulverizovati, supstancu koja se ispituje potrebno je dovoljno navlažiti vodom ili, kada je neophodno, odgovarajućim vehikulumom, kako bi se obezbedio kvalitetan kontakt s kožom. Tečne supstance koje se ispituju obično se koriste nerazblažene. Primenjuje se režim svakodnevne primene tokom perioda od pet do sedam dana nedeljno.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Upotrebljavaju se odrasli pacovi, zečevi ili zamorci. Mogu se upotrebiti i ostale životinjske vrste, s tim da je potrebno da njihova primena bude opravdana. Prilikom započinjanja ispitivanja raspon odstupanja u telesnoj masi treba da bude ± 20% prosečne telesne mase. Kada se ispitivanje subhronične dermalne toksičnosti obavlja kao preliminarno, pre dugotrajnog ispitivanja, u oba ispitivanja se upotrebljavaju životinje iste vrste i istog soja.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Prilikom ispitivanja svakog nivoa doze upotrebljava se najmanje 20 životinja (deset ženki i deset mužjaka) zdrave kože. Biraju se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ukoliko se u međuvremenu planira lišavanje života na human način, broj je potrebno povećati za broj životinja čije se lišavanje života planira pre zaključenja ispitivanja. Može da se uključi i prateća grupa od 20 životinja (10 po polu) kod kojih se primenjuje visok dozni nivo tokom 90 dana i prati prolaznost (reverzibilnost), postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata tokom perioda od 28 dana po isteku perioda tretiranja.

*1.6.2.3. Dozni nivoi*

Upotrebljava se najmanje tri nivoa doze na kontrolnom uzorku i uzorku namenjenom kontroli vehikuluma, ukoliko se primenjuje vehikulum. Vreme izlaganja je najmanje šest sati dnevno. Eksperimentalna supstanca se primenjuje u isto vreme svakog dana, a količina supstance koja se primenjuje periodično se prilagođava (nedeljno ili dvonedeljno) s ciljem održavanja konstantnog nivoa doze s obzirom na telesnu masu životinje. Izuzev tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupa se na isti način kao s ispitanicima u eksperimentalnim grupama. Kada se zbog lakšeg doziranja koristi vehikulum, kontrolna grupa namenjena kontroli vehikuluma dozira se na isti način kao i tretirane grupe i prima količinu vehikuluma jednaku onoj koju prima grupa s najvišim nivoom doze. Najviši dozni nivo treba da dovede do toksičnih efekata, dok smrtnih posledica ne treba da bude ili njihov broj treba da bude zanemarljiv. Najniži dozni nivo ne sme da proizvede bilo kakve dokaze toksičnosti. U situacijama kad postoji primenljiva procena nivoa izloženosti ljudi ispitivanoj supstanci, najniži dozni nivo treba da premašuje navedeni nivo. U idealnom slučaju, srednji dozni nivo treba da dovede do minimalnih vidljivih toksičnih efekata. Ukoliko se koristi više od jedne srednje doze, dozni nivoi treba da budu raspoređeni na način koji za posledicu ima gradaciju toksičnih efekata. U nižim srednjim grupama, kao i u kontrolnim grupama, incidenca smrtnih posledica treba da bude niska, kako bi se omogućila pravilna procena rezultata.

Ukoliko primena supstance koja se ispituje za posledicu ima ozbiljnu iritaciju kože, potrebno je smanjiti koncentraciju, što može dovesti do smanjenja ili nejavljanja ostalih toksičnih efekata pri najvišem nivou doze. Ukoliko je koža teško oštećena može da bude neophodno da se prekine ispitivanje i da se organizuje novo ispitivanje uz korišćenje nižih koncentracija.

*1.6.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ukoliko prilikom preliminarnog ispitivanja sa nivoom doze od 1.000 mg/kg ili višom dozom koja je povezana s mogućom izloženosti ljudi kada je ista poznata, ne nastanu nikakvi toksični efekti, dalje ispitivanje se možda neće smatrati neophodnim.

*1.6.2.5. Period posmatranja*

Eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju da bi se uočili simptomi toksičnosti. Neophodno je zabeležiti vreme smrti i vreme u koje su se pojavili ili nestali simptomi toksičnosti.

**1.6.3. Postupak**

Životinje se pojedinačno smeštaju u kaveze. U idealnom slučaju životinje se ispitivanom supstancom tretiraju sedam dana nedeljno, tokom perioda od 90 dana.

Životinje u bilo kojoj pratećoj grupi, za koje je planirano naknadno posmatranje posle završetka ispitivanja, drže se bez tretmana narednih 28 dana kako bi se otkrio oporavak od ili postojanost toksičnih efekata. Vreme izlaganja je šest sati dnevno.

Ispitivana supstanca se ravnomerno nanosi na područje čija veličina iznosi oko 10% ukupne površine tela. Kad su u pitanju visoko toksične supstance, površinsko područje koje se prekriva može biti manje, ali je potrebno što više navedenog područja prekriti što tanjim i ravnomernijim slojem.

Tokom izlaganja ispitivana supstanca se održava u kontaktu s kožom pomoću poroznog zavoja od gaze i samolepive trake koja ne nadražuje kožu. Područje kože na kojem se ispitivanje obavlja se, na odgovarajući način, dodatno prekriva, kako bi se sačuvao povoj i ispitivana supstanca i kako bi se obezbedilo da životinje ne mogu da progutaju ispitivanu supstancu. Dozvoljeno je delimično imobilisati životinje kako bi se sprečilo gutanje ispitivane supstance, ali se ne preporučuje potpuna imobilizacija.

Po isteku perioda izlaganja potrebno je, kad je moguće, ukloniti ostatke ispitivane supstance korišćenjem vode ili neke druge odgovarajuće metode čišćenja kože.

Sve životinje se svakodnevno prate i beleže se simptomi toksičnosti, uključujući vreme njihovog nastupanja, stepen i trajanje. Opažanja tokom boravka životinja u kavezima obuhvataju: promene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, kao i praćenje respiratornog, cirkulatornog, autonomnog i centralnog nervnog sistema i somatomotorne aktivnosti i obrazaca ponašanja. Potrebno je meriti konzumiranje hrane i telesnu masu životinja na nedeljnom nivou. Neophodno je redovno posmatranje životinja kako bi se obezbedilo da ne dođe do gubitka životinja zbog kanibalizma, autolize tkiva ili pogrešnog smeštanja. Po završetku ispitivanja na svim preživelim ispitanicima u ne-pratećim tretiranim grupama obavlja se postmortalni pregled. Životinje na samrti potrebno je ukloniti i obdukovati.

Na svim životinjama, uključujući kontrolne, obično se obavljaju sledeća ispitivanja:

a) Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili podjednako pogodne opreme potrebno je obaviti pre izlaganja ispitivanoj supstanci i po završetku ispitivanja, najbolje kod svih životinja, ali bar u grupama koje primaju visoku dozu i kontrolnim grupama. Ukoliko se zapaze promene na očima, neophodan je pregled svih životinja.

b) Hematološka ispitivanja, koja uključuju hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita i procenu potencijala zgrušavanja, kao što je vreme zgrušavanja, protrombinsko vreme ili tromboplastinsko vreme ili broja trombocita potrebno je obaviti na kraju perioda ispitivanja.

v) Određivanja u oblasti medicinske biohemije potrebno je obaviti na kraju perioda ispitivanja. Oblasti koje se smatraju odgovarajućim za sva ispitivanja obuhvataju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata i funkciju jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču opažanja o načinu delovanja supstance. Predlaže se utvrđivanje nivoa kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze na prazan želudac (uz primenu perioda gladovanja koje je odgovarajuće za određenu životinjsku vrstu), serumske glutamat piruvat transaminaze**III**, serumske glutamat oksaloacetat transaminaze**IV**, ornitin dekarboksilaze, gama glutamil transpeptidaze, azota iz uree, albumina, kreatinina u krvi, ukupnog bilirubina i ukupnih proteina u serumu.

Ostali nalazi koji mogu biti potrebni zbog odgovarajuće toksikološke procene obuhvataju: analizu lipida, hormona, acidno-bazne ravnoteže, methemoglobina i aktivnosti holinesteraze. Može se primeniti dodatna medicinska biohemija kada je to potrebno zbog proširivanja istraživanja zapaženih efekata.

g) Pregled urina nije deo uobičajene prakse, nego se traži tek onda kada za to postoji indikacija na osnovu očekivane ili zapažene toksičnosti.

Ukoliko osnovni podaci prethodnih istraživanja ne odgovaraju, potrebno je razmotriti da li je neophodno da se pre početka doziranja utvrde parametri hematologije i kliničke biohemije.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**III** Sada poznat kao serumska alanin aminotransferaza.  
**IV** Sada poznat kao serumska aspartat aminotransferaza

*1.6.3.1. Postmortalni pregled (makro-nekropsija)*

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pregled spoljne površine tela, svih telesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Jetra, bubrezi, nadbubrežne žlezde i testisi se mere što je pre moguće posle disekcije kako bi se izbeglo isušivanje.

U odgovarajućem medijumu zbog mogućeg kasnijeg histopatološkog ispitivanja potrebno je sačuvati sledeće organe i tkiva: sve makro lezije, mozak - uključujući delove medule/ponsa, kore malog mozga i moždane kore, hipofizu, štitinu/štitastu žlezdu i tkivo grudne žlezde, (dušnik), pluća, srce, aortu, pljuvačne žlezde, jetru, slezinu, bubrege, nadbubrežne žlezde, pankreas, polne žlezde, uterus, pomoćne polne organe, žučnu kesu (ukoliko postoji), jednjak, želudac, duodenum, tanko crevo, slepo crevo, debelo crevo, mokraćnu bešiku, reprezentativni limfni čvor (ženska mlečna žlezda), (muskulaturu bedra), periferni živac, (oči), (grudnu kost s koštanom srži), (bedrenu kost - uključujući površinu zgloba), (kičmenu moždinu na tri nivoa-cervikalni, srednjetorakalni i lumbalni) i (eksorbitalne suzne žlezde). Tkiva navedena u zagradama pregledaju se samo ukoliko na to ukazuju simptomi toksičnosti ili ako su u pitanju ciljni organi.

*1.6.3.2. Histopatološki pregled*

a) Detaljnu histopatologiju neophodno je obaviti na normalnoj i tretiranoj koži i na organima i tkivima životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane visokim dozama.

b) Neophodan je pregled svih makro-lezija.

v) Pregledaju se ciljni organi u grupama koje su primale ostale doze.

g) Kada se koriste pacovi, pluća životinja u grupama tretiranim niskim i srednjim dozama se podvrgavaju histopatološkom pregledu zbog pronalaženja dokaza o infekciji, s obzirom da se time dolazi do pravilne ocene zdravstvenog stanja životinja. Može se desiti da se dalji histopatološki pregledi ne obavljaju rutinski na životinjama u navedenim grupama, ali se uvek sprovode na organima na kojima postoje dokazi lezija u visoko doziranoj grupi.

d) Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima za koje je utvrđeno da se na njima pokazuju efekti u ostalim tretiranim grupama.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno i prikazuju: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj eksperimentalnoj grupi, broj životinja kod kojih su se pojavile lezije, vrstu lezija i procenat životinja kod kojih se pojavila svaka pojedina vrsta lezija.

Rezultati se procenjuju pomoću odgovarajuće statističke metode i može se primeniti bilo koja priznata statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- životinjskoj vrsti, soju, poreklu, uslovima okoline, ishrani;

- uslovima ispitivanja;

- nivoima doza (uključujući vehikulum ukoliko se koristi) i koncentracije;

- toksičnom efektu prema polu i dozi;

- nivou na kome nisu opaženi bilo kakvi efekti, kada je to moguće;

- vremenu smrti tokom ispitivanja ili podatke da li su životinje preživele do usmrćenja;

- opisu toksičnih i ostalih efekata;

- vremenu zapažanja svakog patološkog znaka i njegov kasniji tok;

- hrani i telesnoj masi;

- oftalmološkim nalazima;

- primenjenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima;

- primenjenim ispitivanjima medicinske biohemije i svim rezultatima (uključujući rezultate svakog pregleda mokraće);

- nalazima obdukcije;

- detaljnom opisu svih histopatoloških nalaza;

- statističkoj obradi rezultata kada je moguće;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.29. SUBHRONIČNA INHALACIONA TOKSIČNOST - STUDIJA PONOVLJENIH INHALACIONIH DOZA NA GLODARIMA, 90 DANA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Nekoliko grupa eksperimentalnih životinja izlaže se određeno vreme svakodnevno supstanci koja se ispituje u rastućim koncentracijama, pri čemu se na jednu grupu primenjuje jedna koncentracija u trajanju od 90 dana. Kada se koristi pomoćno sredstvo da bi se dobile odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi, koristi se i kontrolna grupa. Za vreme primene, životinje se svakodnevno posmatraju zbog otkrivanja znakova toksičnosti. Životinje koje za vreme ispitivanja uginu postmortalno se pregledaju, a po završetku ispitivanja i preživele životinje se postmortalno pregledaju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Životinje se drže i hrane pod eksperimentalnim uslovima najmanje pet dana pre ispitivanja. Pre ispitivanja, zdrave mlade životinje se nasumce izdvajaju i dodeljuju grupama koje se tretiraju i kontrolnim grupama. Gde je potrebno, ispitivanoj supstanci može se dodati pomoćno sredstvo da bi se pripremile odgovarajuće koncentracije supstance u atmosferi. Ako se pomoćno sredstvo ili drugi dodaci koriste za olakšavanje doziranja mora biti poznato da ne proizvode toksične efekte. Ukoliko odgovara, koriste se podaci iz ranije studije.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Ukoliko ne postoje kontraindikacije, koriste se pacovi. Uzimaju se laboratorijske vrste mladih zdravih životinja koje se uobičajeno koriste. Na početku studije, raspon promena u telesnoj masi korišćenih životinja ne sme da prelazi ± 20% odgovarajuće srednje vrednosti. Ako se vodi studija subhronične inhalacije kao uvod u dugoročnu studiju, u obe studije koriste se iste vrste.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Za svaku koncentraciju izlaganja koristi se najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka). Uzimaju se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju lišavanja života na human način u toku eksperimenta, broj se povećava za broj životinja koje su planirane za lišavanje života pre završetka studije. Prateća grupa od 20 životinja (10 životinja po polu) izlaže se u trajanju od deset dana visokoj koncentraciji i posmatra, kako bi se registrovala reverzibilnost, postojanost ili zakasnela pojava toksičnih efekata 28 dana po završetku tretmana.

*1.6.2.3. Koncentracije*

Ako se koristi pomoćno sredstvo, potrebne su najmanje tri koncentracije, s kontrolom ili kontrolom pomoćnog sredstva (koje odgovara koncentraciji pomoćnog sredstva na najvišem nivou). Osim tretmana eksperimentalnom supstancom, prema životinjama u kontrolnoj grupi se postupa na isti način kao s onima u eksperimentalnoj grupi. Najviše koncentracije pokazuju toksične efekte, ali ni jedan smrtni slučaj ili samo nekoliko smrtnih slučajeva. Ako postoji primenljiva procena izloženosti ljudi, najniži nivo primenjen na životinjama premašuje tu vrednost. U idealnom slučaju, srednja koncentracija proizvodi minimalno primetne toksične efekte. Ako se koristi više od jedne srednje koncentracije, njihove vrednosti su dovoljno različite da se postigne gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primenjene niske ili srednje koncentracije, kao i kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja je niska, kako bi procena rezultata imala smisla.

*1.6.2.4. Vreme izlaganja*

Dnevno vreme izlaganja je šest sati posle izjednačavanja koncentracija u komorama, ali se mogu odrediti i drugi vremenski intervali kada postoje posebni zahtevi.

*1.6.2.5. Oprema*

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionoj opremi koja je dizajnirana tako da održava konstantni protok vazduha s najmanje 12 potpunih izmena u jednom satu, kako bi se obezbedila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnomerno raspoređena atmosfera ekspozicije. Tamo gde se koristi komora, njen dizajn je dovoljno prostran da minimalizuje prenaseljenost životinja i maksimalizuje njihovu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Kao opšte pravilo koje obezbeđuje stabilnost atmosfere u komori, koristi se mera, prema kojoj ukupna zapremina eksperimentalnih životinja ne sme da prelazi 5% zapremine komore. Mogu se koristiti različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost samo oro-nazalnih otvora, glave ili čitavog tela, pri čemu prve dve smanjuju preuzimanje ispitivane supstance drugim putevima.

*1.6.2.6. Vreme posmatranja*

Eksperimentalne životinje posmatraju se svakog dana tokom perioda tretiranja kao i za vreme oporavka kako bi se uočili znakovi toksičnosti. Važno je registrovati vreme kad se jave ili nestanu prvi znakovi trovanja, kao i vreme smrti.

**1.6.3. Postupak**

Životinje se izlažu ispitivanoj supstanci svakog dana, pet do sedam dana nedeljno, u periodu od 90 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviđene za kasnija posmatranja, drže se još 20 dana bez tretmana, kako bi se utvrdila postojanost toksičnih efekata ili oporavak od istih. Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje se održava na 22° C ± 3° C. U idealnim uslovima, relativna vlažnost je između 30% i 70%, ali u nekim slučajevima (npr. ispitivanja aerosola) to nije izvodljivo. Za vreme izlaganja, životinjama se ne daje voda i hrana.

Tokom eksperimenta koristi se dinamički inhalacioni sistem s odgovarajućim sistemom analitičke kontrole koncentracije. Kako bi se uspostavile odgovarajuće koncentracije preporučuje se obavljanje probnog ispitivanja. Protok vazduha se podešava tako da se obezbedi homogenost uslova u komori. Sistem omogućava da se stabilni uslovi izlaganja postižu što je moguće brže.

Obavljaju se merenja i prate sledeći parametri:

a) brzina protoka vazduha (neprekidno);

b) koncentracija ispitivane supstance merena u području udisanja. Za vreme izlaganja u toku jednog dana koncentracija ispitivane supstance ne sme da varira više od ± 15% od srednje vrednosti. Kod prašine i aerosola, možda nije moguće postići taj nivo kontrole pa se toleriše širi opseg vrednosti. Za vreme trajanja čitavog eksperimenta, koncentracije se iz dana u dan drže konstantnim koliko god je izvodljivo. Za vreme razvoja sistema vrše se analize veličina čestica da bi se utvrdila stabilnost koncentracija aerosola. Tokom izlaganja, analize se obavljaju u vremenskim intervalima u kojima je to neophodno za određivanje konzistencije raspodele veličina čestica;

v) temperatura i vlažnost;

g) za vreme i posle izlaganja, opažanja se sistematično registruju; za svaku životinju vodi se poseban zapisnik.

Životinje se posmatraju svakodnevno, a znakovi toksičnosti se evidentiraju, uključujući vreme njihovog prvog javljanja, stepen i trajanje. Registruju se promene na koži i krznu, očima, sluznicama, respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno mere se telesna masa životinja i unos hrane. Potrebno je redovno pratiti životinje da bi se izbegao njihov gubitak zbog kanibalizma, autolize tkiva ili drugo. Na kraju perioda izlaganja obavlja se postmortalni pregled svih preživelih životinja. Životinje koje su na samrti izdvajaju se i postmortalno pregledaju, kad se primeti da su jako slabe.

Na svim životinjama, uključujući i one iz kontrolne grupe, obično se rade sledeća ispitivanja:

a) oftalmološki pregled uz korišćenje oftalmoskopa ili sličnog odgovarajućeg instrumenta vrši se pre izlaganja ispitivanoj supstanci i na kraju studije, obično na svim životinjama ili bar na onima koje su bile izložene visokoj dozi i životinjama u kontrolnim grupama. Ako se otkriju promene na očima, potrebno je pregledati sve životinje;

b) hematološke analize, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupan i diferencijalni broj leukocita i potencijal zgrušavanja krvi kao što je: vreme zgrušavanja, protrombinsko vreme, tromboplastinsko vreme ili broj trombocita, vrše se na kraju perioda ispitivanja;

v) medicinsko biohemijska određivanja u krvi obavljaju se na kraju perioda ispitivanja. Područja ispitivanja koja se smatraju važnim za sve studije su: ravnoteža elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata, funkcija jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču posmatranja mehanizma delovanja supstance. Predložena određivanja su: kalcijum, fosfor, hlorid, natrijum, kalijum, glukoza u uslovima gladovanja (s vremenom gladovanja koje je odgovarajuće za vrstu), serumska glutamat piruvat transaminaza**V**, serumska glutamat oksaloacetat transaminaza**VI**, ornitin deksarboksilaza, gama glutamil transpeptidaza, azot u ureji, albumin, kreatinin u krvi, ukupni bilirubin i merenja ukupnih proteina u serumu. Druga određivanja koja mogu da budu potrebna za adekvatnu toksikološku procenu obuhvataju: analize lipida, hormona, acidobaznu ravnotežu, methemoglobin i aktivnost holinesteraze. Dodatne biohemijske analize mogu se uključiti kada je potrebno proširiti ispitivanje posmatranih efekata;

g) analiza urina nije rutinski potrebna, samo ako postoji indikacija zasnovana na očekivanoj ili primećenoj toksičnosti.

Ako su osnovni podaci iz ranije studije nedovoljni, razmatra se određivanje hematoloških i medicinsko biohemijskih parametara pre početka doziranja.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**V** Sada poznata kao serumska alanin aminotransferaza.  
**VI** Sada poznata kao serumska aspartat aminotransferaza.

*1.6.3.1. Postmortalni pregled*

Sve životinje podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji obuhvata pregled spoljne površine tela, svih otvora, lobanjske, grudne i trbušne šupljine i njihovih sadržaja. Odmah posle sekcije, još mokri, mere se sledeći organi: jetra, bubrezi, žlezde i testisi. Merenje se sprovodi što pre posle sekcije, da se organi ne bi osušili. U prikladnom medijumu za eventualni budući histopatološki pregled čuvaju se sledeći organi i tkiva: sve velike lezije, pluća - koja se vade intaktna, mere se i tretiraju odgovarajućim fiksativom kako bi se očuvale sve strukture organa (perfuzija s fiksativom smatra se efikasnom procedurom), nazofaringealno tkivo, mozak - uključujući delove moždine/pons, kore malog mozga(cerebelarni korteks) i moždane kore (cerebralni korteks), hipofizno, tiroidno/paratiroidni i bilo koje timusno tkivo, dušnik, pluća, srce, aorta, pljuvačne žlezde, jetra, slezina, bubrezi, nadbubrežne žlezde, gušterača, gonade, materica (pripadajući genitalni organi), (koža), žučna kesica (ako postoji), jednjak, želudac, dvanaestopalačno crevo, tanko crevo, slepo crevo, debelo crevo, rektum, mokraćna bešika, limfni čvorovi (ženske mlečne žlezde), (bedrena muskulatura), periferni živci, (oči), grudna kost sa koštanom srži (femur, uključujući zglobne površine) i (kičmena moždina u tri nivoa - cervikalni, srednjetorakalni i lumbalni). Tkiva navedena u zagradama pregledaju se samo ako postoje znaci toksičnosti ili ako se radi o ciljnom organu.

*1.6.3.2. Histopatološka ispitivanja*

a) Kompletna histopatološka posmatranja obavljaju se na respiratornom traktu i drugim organima i tkivima svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su bile izložene visokim koncentracijama.

b) Sve velike lezije se pregledaju.

v) Pregledaju se ciljni organi u grupama koje su podvrgnute drugim koncentracijama.

g) Histopatološki se pregledaju i pluća životinja koje su podvrgnute niskim i srednjim koncentracijama, jer se na taj način može objektivno utvrditi zdravstveno stanje životinja. Dalji histopatološki pregledi rutinski se ne obavljaju na životinjama u tim grupama, ali se uvek obavljaju na organima na kojima su vidljive lezije u grupi podvrgnutoj visokoj koncentraciji.

d) Kad se koristi prateća grupa, histopatološki se obrađuju tkiva i organi koji pokazuju iste efekte kao i kod životinja iz drugih ispitanih grupa.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno, gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja s lezijama, vrste lezija i procenat životinja kod kojih su pronađene lezije. Rezultati se procenjuju odgovarajućom statističkom metodom. Može se koristiti bilo koja usvojena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

- vrsti, varijetetu, izvoru, uslovima okoline, ishrane;

- eksperimentalnim uslovima: opis aparature za izlaganje, uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za raspršivanje aerosola, metoda kondicioniranja vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i način čuvanja životinja u komori. Potrebno je opisati i aparaturu za merenje temperature, vlažnosti i kada odgovara, stabilnost koncentracija aerosola ili veličina čestica;

- izlaganju ispitivanoj supstanci koji se prikazuju tabelarno zajedno sa srednjim vrednostima i merom odstupanja (npr. standardna devijacija) i obuhvataju:

a) brzinu protoka vazduha kroz inhalacionu opremu;

b) temperaturu i vlažnost vazduha;

v) nominalnu koncentraciju (ukupan sadržaj ispitivane supstance koja se uvodi kroz inhalacionu opremu, podeljena sa zapreminom vazduha);

g) prirodu pomoćnog sredstva, ako se koristilo;

d) tačne koncentracije supstance u zoni udisanja;

đ) srednje veličine čestica (kada je potrebno);

- toksičnim efektima po polu i koncentraciji;

- nivou bez efekta ako je moguće;

- vremenu smrti u toku eksperimenta ili da li su životinje preživele do kraja eksperimenta;

- opisu toksičnih ili drugih efekata;

- vremenu posmatranja bilo kakvih abnormalnosti i njihov kasniji tok;

- hranjenju i telesnoj masi;

- oftalmološkim nalazima;

- hematološkim ispitivanjima koja su primenjena i nalazima;

- medicinsko-biohemijskim ispitivanjima i nalazima (uključivši nalaze analize urina);

- nalazima obdukcije;

- detaljnom opisu svih histopatoloških nalaza;

- statističkoj obradi rezultata gde je moguće;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.30. ISPITIVANJE HRONIČNE TOKSIČNOSTI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca se obično primenjuje sedam dana nedeljno, odgovarajućim putem, kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, jedna doza po grupi, kroz duži period njihovog životnog veka. Za vreme i posle izloženosti ispitivanoj supstanci, eksperimentalne životinje se posmatraju svakodnevno, kako bi se otkrili znaci toksičnosti.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Životinje se drže pod eksperimentalnim uslovima čuvanja i hranjenja najmanje pet dana pre ispitivanja. Pre ispitivanja slučajnim izborom zdrave mlade životinje se svrstavaju u tretirane i kontrolne grupe.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Preporučena vrsta je pacov. Mogu se koristiti i druge vrste (glodara ili drugih životinja), na osnovu rezultata prethodnih studija. Ispitivanju se podvrgavaju zdravi mladi primerci životinja onih laboratorijskih vrsta koje se najčešće koriste u ovakvim eksperimentima, a primena doze započinje u što kraćem vremenskom roku posle odbijanja od sise.

Na početku studije varijacije u telesnoj masi korišćenih životinja ne smeju prelaziti ± 20% srednje vrednosti. Ako se izvodi subhronična oralna studija kao uvod u dugoročnu studiju, u obe studije koriste se iste vrste i varijeteti.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu koristi se najmanje 40 životinja (20 ženki i 20 mužjaka). Uzimaju se ženke koje nikad nisu rađale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju lišavanja života na human način u toku eksperimenta, broj se povećava za broj životinja koje su planirane za lišavanje života pre završetka studije.

Za vrste koje ne pripadaju glodarima prihvatljiv je manji broj životinja, ali najmanje četiri životinje po polu po grupi.

*1.6.2.3. Dozni nivoi i učestalost izlaganja*

Koriste se najmanje tri nivoa doze ispitivane supstance zajedno s istovremenom kontrolnom grupom. Najviša doza treba da pokaže toksične efekte, ali bez velikog broja smrtnih slučajeva. Najniža doza ne sme da izazove i pokaže toksičnost.

Srednja doza utvrđuje se u rasponu između visokih i niskih doza.

Kod izbora nivoa doza uzimaju se u obzir podaci iz prethodnih ispitivanja i studija toksičnosti.

Životinje se obično svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili se umeša u hranu, uvek je na raspolaganju.

*1.6.2.4. Kontrole*

Istovremeno se koristi kontrolna grupa koje je u svakom pogledu identična eksperimentalnim grupama, osim izloženosti ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima, kao što su inhalacione studije koje obuhvataju aerosole ili korišćenje emulgatora čija biološka aktivnost nije okarakterisana u oralnim studijama, istovremeno se koristi i negativna kontrolna grupa. Negativna kontrolna grupa tretira se na isti način kao i eksperimentalne grupe, samo što se životinje ne izlažu ispitivanoj supstanci niti bilo kom pomoćnom sredstvu.

*1.6.2.5. Put primene*

Dva glavna puta primene su oralni i inhalacioni. Izbor puta primene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i od mogućeg puta unosa kod ljudi.

Korišćenje dermalnog puta predstavlja značajan praktični problem. O hroničnoj sistemskoj toksičnosti koja proizlazi iz perkutane apsorpcije može se izvesti zaključak iz rezultata drugog oralnog ispitivanja i znanja o stepenu perkutane apsorpcije dobijenom iz prethodnih ispitivanja perkutane toksičnosti.

*1.6.2.6. Studije sa peroralnim putem primene*

Kad se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i ako je to put unosa kojim mogu biti izloženi ljudi, predlaže se peroralni put primene, osim ako postoje kontraindikacije.

Životinje mogu da dobijaju ispitivanu supstancu u hrani, rastvorenu u vodi za piće ili im se može davati u kapsulama.

Idealno je dnevno doziranje tokom sedam dana nedeljno, jer primena određene doze na bazi pet dana nedeljno može da omogući oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu u kojem se ne primenjuje ispitivana supstanca i time da utiče na rezultat i kasniju procenu. Sa stanovišta prakse, doziranje na bazi pet dana nedeljno smatra se prihvatljivim.

*1.6.2.7. Studije sa inhalacionim putem primene*

Kako studije sa inhalacionim putem primene predstavljaju tehnički problem koji je složeniji od drugih puteva primene, ovde se detaljnije navodi taj način primene. Napominje se da intratrahealno ulivanje može biti dobra alternativa u specifičnim situacijama.

Dugoročno izlaganje obično se planira prema projektovanoj izloženosti ljudi. Životinje se dnevno izlažu šest sati posle izjednačenja koncentracija u komori, pet dana u nedelji (isprekidana izloženost) ili, pogodnoj ambijentalnoj izloženosti, 22 do 24 sata izloženosti dnevno tokom sedam dana nedeljno (neprekidna izloženost) sa jednim satom za hranjenje životinja u slično vreme svakog dana i za održavanje komore. U oba slučaja životinje se izlažu fiksnim koncentracijama ispitivane supstance. Najveća razlika između isprekidane i neprekidne izloženosti je što u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom koga se životinje mogu oporaviti od efekata svakodnevne izloženosti, sa čak i dužim vremenom oporavka tokom vikenda.

Izbor isprekidane ili neprekidne izloženosti zavisi od ciljeva studije i od izloženosti ljudi koja će se simulirati. Razmatraju se određene tehničke teškoće. Na primer, prednosti neprekidne izloženosti koja simulira uslove životne sredine mogu se poništiti potrebom davanja vode i hranjenja za vreme izloženosti i potrebom za složenijim (i pouzdanim) tehnikama za stvaranje i posmatranje aerosola i pare.

*1.6.2.8. Komore za izlaganje*

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionim komorama dizajniranim tako da održavaju dinamičan protok vazduha s najmanje 12 izmena vazduha u jednom satu, kako bi se osigurala odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnomerno raspoređena atmosfera. Kontrolne komore i komore za izlaganje su jednake u konstrukciji i dizajnirane tako da obezbeđuju uslove izlaganja koji su uporedivi u svim pogledima, izuzev izloženosti ispitivanoj supstanci. Slabi negativni pritisak u komori se uglavnom održava za sprečavanje ispuštanja ispitivane supstance u okolno područje. Komore minimizuju prenaseljenost eksperimentalnih životinja. Kao opšte pravilo koje obezbeđuje stabilnost atmosfere u komori, koristi se mera prema kojoj zapremina eksperimentalnih životinja ne sme prelaziti 5% zapremine komore.

Mere se i prate sledeći parametri:

a) Protok vazduha: preporučuje se da se brzina protoka vazduha prati neprekidno;

b) Koncentracija: u periodu dnevnog izlaganja koncentracija ispitivane supstance ne sme da varira više od ± 15% od srednje vrednosti;

v) Temperatura i vlaga: za glodare se temperatura održava na 22° C ± 2° C, a vlaga u komori na 30% do 70%, osim ako se koristi voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Preporučuje se da se temperatura i vlaga prate neprekidno;

g) Merenja veličine čestica: raspodela veličine čestica određuje se u atmosferi komore koje sadrže tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su takve veličine da ih eksperimentalne životinje mogu udisati. Uzorci vazduha komore uzimaju se u zoni disanja životinja. Uzorak vazduha mora biti tipičan predstavnik raspodele čestica kojima su životinje izložene i obuhvata, na gravimetrijskoj bazi, sav suspendovani aerosol, čak i ako se mnogo aerosola ne može udisati. Za vreme razvoja generišućeg sistema često se obavljaju analize veličine čestica da bi se obezbedila stabilnost aerosola, a posle toga se analize veličine čestice obavljaju onoliko često koliko zahteva vreme izlaganja, da bi se pravilno odredila konzistencija raspodele čestica kojima su životinje bile izložene.

*1.6.2.9. Trajanje ispitivanja*

Period davanja je najmanje 12 meseci.

**1.6.3. Postupak**

*1.6.3.1. Posmatranja*

Pažljivo kliničko ispitivanje obavlja se najmanje jednom dnevno. Dodatna posmatranja obavljaju se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih mera kako bi se gubitak životinja za vreme izvođenja studije sveo na minimum, na primer postmortalni pregled ili zaleđavanje onih životinja koje se pronađu mrtve i izolacija ili lišavanje života na human način slabih životinja ili životinja na samrti. Obavljaju se pažljiva posmatranja da bi se otkrio početak i napredovanje toksičnih efekata, kao i da bi se sveo na minimum gubitak zbog bolesti, autolize ili kanibalizma.

Klinički znaci, uključujući neurološke promene i promene na očima, beleže se za sve životinje. Beleže se i vreme početka i napredovanje toksičnih efekata, uključujući sumnjive tumore.

Telesne mase beleže se pojedinačno za sve životinje jednom nedeljno u prvih 13 nedelja perioda ispitivanja, a posle toga najmanje jednom svake četiri nedelje. Uzimanje hrane određuje se nedeljno za vreme prvih 13 nedelja studije, a potom u intervalima od oko tri meseca, osim ako zdravstveno stanje ili promene u telesnoj masi ne diktiraju drugačije.

*1.6.3.2. Hematološki pregled*

Hematološki pregled (npr. sadržaj hemoglobina; ukupna zapremina krvnih ćelija; ukupan broj eritrocita, ukupan broj leukocita, trombocita ili merenja drugih parametara koagulacije) obavlja se posle tri meseca, posle šest meseci, a posle toga u intervalima od oko šest meseci i po završetku ispitivanja iz uzoraka krvi svih životinja koje nisu glodari i uzoraka krvi 10 pacova po polu svih grupa. Ako je moguće, uzorci su od istih pacova u svakom intervalu. Uzimaju se i uzorci od životinja koje nisu glodari.

Ako klinička posmatranja daju nagoveštaj pogoršanja zdravlja životinja za vreme studije, od životinja kod kojih se naslućuje pogoršanje zdravlja, uzimaju se uzorci krvi i radi se diferencijalna krvna slika.

Diferencijalna krvna slika radi se kod životinja iz grupe koja je podvrgnuta najvišoj dozi i kod kontrolne grupe. Diferencijalna krvna slika radi se kod životinja koje su podvrgnute nešto manjoj dozi samo ako postoji velika razlika između grupe sa najvišom dozom i kontrolne grupe ili ako je indikovana na osnovu patoloških nalaza.

*1.6.3.3. Analiza mokraće*

Za analizu se uzimaju uzorci mokraće od životinja koje nisu glodari i od 10 pacova po polu, ako je moguće od istih pacova u jednakim intervalima u kojima se obavljaju i hematološke analize. Kod pojedinačnih životinja ili na zbirnim ("pool") uzorcima po polu i po grupi za glodare određuju se:

- izgled: zapremina i gustina za pojedinačne životinje;

- proteini, glukoza, ketoni, skriveno krvarenje (semikvantitativno);

- mikroskopski pregled sedimenta (semikvantitativno);

- medicinska biohemija.

U intervalima od oko šest meseci i na kraju ispitivanja, uzimaju se uzorci krvi za medicinsko-biohemijska merenja od svih životinja koje nisu glodari i 10 pacova po polu svih grupa, po mogućnosti od istih pacova u svakom intervalu. Uzorci za preliminarna ispitivanja uzimaju se od životinja koje nisu glodari. U plazmi tih uzoraka određuju se:

- koncentracija ukupnih proteina;

- koncentracija albumina;

- ispitivanja funkcije jetre (kao što je aktivnost alkalne fosfataze, glutaminske piruvat transaminaze**VII**, aktivnost glutaminske oksaloacetatne transaminaze**VIII**), gama glutamil transpeptidaze, ornitin dekarboksilaze;

- metabolizam ugljenih hidrata, kao što je glukoza u krvi posle gladovanja;

- ispitivanja funkcije bubrega kao što je azot iz uree u krvi.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**VII** Sada poznata kao serumska alanin aminotransferaza.  
**VIII** Sada poznata kao serumska aspartat amintransferaza.

*1.6.3.4. Postmortalni pregled*

Postmortalni pregled se obavlja na svim životinjama, uključujući one koje su uginule za vreme eksperimenta ili su lišene života na human način jer su bile na samrti. Pre lišavanja života na human način od svih životinja uzimaju se uzorci krvi za diferencijalnu krvnu sliku. Čuvaju se sve vidljive lezije, tumori ili lezije za koje se sumnja da su tumori. Pokušava se da se dovedu u vezu opažene promene s mikroskopskim nalazima.

Svi organi i tkiva čuvaju se za histopatološke preglede. Ovo se obično odnosi na sledeće organe i tkiva: mozak**IX** (medula i pons, cerebelarni korteks, cerebralni korteks), hipofiza, štitna žlezda (uključujući paratioroidnu žlezdu), timus, pluća (uključujući traheju), srce, aorta, pljuvačne žlezde, jetra**IX**, slezina, bubrezi**IX**, nadbubrežne žlezde**IX**, jednjak, želudac, duodenum, tanko crevo, slepo crevo, debelo crevo, rektum, materica, mokraćna bešika, limfni čvorovi, pankreas, polne žlezde**IX**, ostali genitalni organi, kod ženki mlečne žlezde, koža, muskulatura, periferni živci, kičmena moždina (cervikalna, torakalna, lumbalna), grudna kost s koštanom srži (uključujući zglobove) i oči. Za odgovarajući histopatološki pregled važno je naduvavanje pluća i mokraćne bešike sa fiksativom na optimalan način da se sačuvaju ta tkiva, kao i naduvavanje pluća kod inhalacionih studija. U posebnim studijama, kao što su inhalacione studije, pregleda se celokupan respiratorni trakt, uključujući nos, ždrelo i grkljan.

Ako su obavljeni drugi klinički pregledi, dobijeni rezultati su na raspolaganju pre mikroskopskog pregleda, jer to može biti smernica za patologa.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**IX** Mere se organi od deset životinja po polu po grupi za glodare i životinje koje nisu glodari, plus tiroidna žlezda (s paratiroidnim žlezdama) za životinje koje nisu glodari.

*1.6.3.5. Histopatologija*

Sve vidljive promene, naročito tumori i druge lezije nastale u bilo kom organu, mikroskopski se pregledaju. Preporučuju se sledeći postupci:

a) Mikroskopski pregled svih sačuvanih organa i tkiva s kompletnim opisom svih lezija nađenih:

1) kod svih životinja koje su uginule ili su lišene života na human način za vreme studije;

2) u svim grupama koje su dobijale visoku dozu i u kontrolnoj grupi;

b) Organi ili tkiva kod kojih su pronađene abnormalnosti uzrokovane ili verovatno uzrokovane ispitivanom supstancom ispituju se i kod životinja iz grupa sa nižom dozom;

v) Ako rezultat ispitivanja dokaže bitno skraćenje normalnog životnog veka životinje ili efekte koji mogu da utiču na toksičnu reakciju, naredni niži dozni nivo ispituje se na način koji je gore opisan;

g) Za ispravnu procenu značaja promena koje su primećene kod tretiranih životinja neophodni su podaci o nastanku lezija do kojih obično dolazi kod vrste životinja koje se koriste, pod istim laboratorijskim uslovima, tj. istorijski kontrolni podaci.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno, gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja sa lezijama i procenat životinja sa svakom vrstom lezije. Svi dobijeni rezultati analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Može se koristiti bilo koja usvojena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

- vrsti, varijetetu, izvoru, uslovima sredine, ishrane;

- eksperimentalnim uslovima: aparaturi za izlaganje ispitivanoj supstanci uključujući dizajn, vrstu, dimenzije aparature, kao i izvor vazduha, sistem za proizvodnju čestica i aerosola, metoda za kondicioniranje vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i metoda čuvanja životinja u komori. Opisuje se oprema za merenje temperature, vlage i, gde je moguće, stabilnost koncentracije aerosola ili veličinu čestice;

- izlaganju ispitivanoj supstanci: ovi podaci se prikazuju tabelarno sa srednjim vrednostima i merama varijabilnosti (npr. standardna devijacija) i obuhvataju podatke o:

a) brzini protoka vazduha kroz opremu za inhalaciju;

b) temperaturi i vlažnosti vazduha;

v) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi u opremu za inhalaciju, podeljenim sa zapreminom vazduha);

g) prirodi pomoćnog sredstva, ako je korišćen;

d) stvarnim koncentracijama supstance u zoni udisanja;

đ) srednjoj veličini čestica (gde je potrebno),

- visini doze (uključujući i pomoćno sredstvo, ako se koristilo) i koncentracije;

- toksičnoj reakciji po polu i dozi;

- nivou bez efekta;

- vremenu smrti za vreme studije ili da li su životinje preživele do kraja eksperimenta;

- opis toksičnih i drugih efekata;

- vremenu kada je primećen svaki znak abnormalnosti i njegov kasniji tok;

- hrani i telesnoj masi;

- oftalmološkim nalazima;

- hematološkim ispitivanja i svim rezultatima;

- medicinsko biohemijskim ispitivanjima i svim rezultatima (uključujući rezultate analize urina);

- nalazima obdukcije;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- statističkoj proceni rezultata, gde je moguće;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.31. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PO PRENATALNI RAST I RAZVOJ**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 414 (2001).

*1.1. UVOD*

Ova metoda za ispitivanje toksičnosti po rast i razvoj namenjena je za dobijanje opštih podataka o efektima prenatalnog izlaganja na gravidne eksperimentalne životinje i na organizam tokom rasta i razvoja u materici. Ovo može da obuhvati procenu efekata na majku, kao i smrt, strukturalne abnormalnosti ili izmenjen rast ploda. Funkcionalni nedostaci, iako čine važan deo rasta i razvoja, nisu sastavni deo ove metode ispitivanja. Oni se mogu ispitivati u posebnoj studiji ili kao dodatak ovaj studiji, korišćenjem metode ispitivanja neurotoksičnosti po rast i razvoj. Podaci o ispitivanju funkcionalnih nedostataka i drugih efekata posle rođenja, se traže u odgovarajućem ispitivanju reproduktivne toksičnosti na dve generacije i ispitivanju neurotoksičnosti po rast i razvoj.

Ova metoda ispitivanja može zahtevati specifično prilagođavanje u pojedinačnim slučajevima na osnovu specifičnog znanja o npr. fizičkim i hemijskim ili toksikološkim svojstvima ispitivane supstance. Takvo prilagođavanje je prihvatljivo ako uverljivi naučni dokazi pokazuju da će se prilagođavanjem dobiti bolji kvalitet podataka. U takvom slučaju, ovi naučni dokazi pažljivo se dokumentuju u izveštaju o ispitivanju.

*1.2. DEFINICIJE*

Toksikologija rasta i razvoja jeste studija o štetnim efektima na organizam tokom rasta i razvoja koji se mogu pojaviti kao posledica izlaganja pre začeća, tokom prenatalnog rasta i razvoja ili postnatalno do vremena polnog sazrevanja. Najveće manifestacije toksičnosti po rast i razvoj obuhvataju: 1) smrt organizma, 2) strukturalne abnormalnosti, 3) izmenjeni rast, 4) funkcionalne nedostatke. Toksikologija rasta i razvoja se ranije često nazivala teratologija.

Štetni efekat jeste svaka promena polaznog stanja povezana sa tretmanom koja umanjuje sposobnost organizma da preživi, reprodukuje se ili prilagodi životnoj sredini. U najširem smislu, toksikologija rasta i razvoja obuhvata svaki efekat koji remeti normalan razvoj zametka i pre i posle rođenja.

Izmenjen rast jeste promena mase ili veličine organa ili organizma potomaka.

Alteracije (anomalije) jesu strukturne promene u rastu i razvoju koje obuhvataju i malformacije i varijacije**28**.

Malformacija/veća abnormalnost jeste strukturna promena koja se smatra štetnom za životinju (može biti i smrtonosna) i obično je retka.

Varijacija/manja abnormalnost jeste strukturna promena za koju se smatra da ima mali ili nikakav štetan efekt na životinju; može biti prolazna i može se pojaviti relativno često u kontrolnoj populaciji.

Zametak jeste zbir derivata oplođenog jajašca u bilo kojoj fazi rasta i razvoja od oplodnje do rođenja, uključujući ekstraembrionalne membrane, kao i embrion ili plod.

Implantacija (nidacija) jeste pripajanje blastocista na epitelni sloj materice, uključujući njegovu penetraciju kroz epitel materice i usađivanje u endometrijum.

Embrion jeste rana ili razvojna faza bilo kog organizma, naročito proizvoda oplođenja jajašca koji se razvija posle pojave dugačke ose i do pojave svih većih struktura.

Embriotoksičnost jeste štetnost za normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja embriona.

Plod jeste nerođeni potomak u periodu posle embrionalnog.

Fetotoksičnost jeste štetnost za normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja ploda.

Pobačaj jeste prevremeno izbacivanje proizvoda začeća iz materice: embriona ili ploda koji nije sposoban za preživljavanje.

Resorpcija jeste zametak koji, posle implantacije u matericu, kasnije umre i resorbuje se ili je resorbovan.

Rana resorpcija jeste dokaz o implantaciji bez prepoznatljivog embriona/ploda.

Kasna resorpcija jeste mrtvi embrion ili plod sa spoljnjim degenerativnim promenama.

NOAEL jeste skraćenica za najviši nivo doze ili izlaganja, kod koga nisu primećeni štetni efekti povezani sa tretmanom.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Obično se ispitivana supstanca daje gravidnim životinjama najmanje od implantacije do jednog dana pre dana planiranog lišavanja života na human način, koji je što bliži normalnom danu porođaja bez opasnosti od gubitka podataka koji proizlaze iz preranog porođaja. Eksperimentalna metoda nije namenjena samo za ispitivanje perioda organogeneze (tj. 5 do 15 dana kod glodara i 6 do 18 dana kod kunića), nego i za ispitivanje efekata od preimplantacije, ako odgovara, tokom čitavog perioda gestacije do dana pre carskog reza. Malo pre carskog reza ženke se lišavaju života na human način, pregleda se sadržaj materice, a plodovi se procenjuju prema spoljnim vidljivim anomalijama, kao i prema promenama na mekim tkivima i kosturu.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Izbor životinjske vrste**

Preporučuje se da se ispitivanje obavlja na najrelevantnijim vrstama i da se koriste laboratorijske vrste i varijeteti koji se obično koriste kod ispitivanja toksičnosti po prenatalni rast i razvoj. Preporučena vrsta glodara je pacov, a preporučena vrsta koja ne pripada glodarima je kunić. Kada se koriste životinje drugih vrsta navodi se razlog za ovo korišćenje.

**1.5.2. Uslovi smeštaja i ishrana**

Temperatura eksperimentalne sobe gde se drže životinje je 22° C (± 3° C) za glodare, a 18° C (± 3 °C) za kuniće. Relativna vlažnost vazduha iznosi najmanje 30% ali ne više od 70% osim kad se prostorije čiste. Najbolje je održavati vlažnost vazduha između 50% i 60%. Osvetljenje je veštačko i to u intervalima 12 sati svetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se mogu primenjivati ustaljene laboratorijske dijete sa neograničenim količinama vode za piće. Postupak parenja se izvodi u kavezima koji su odgovarajući za tu svrhu. Parene životinje preporučljivo je držati pojedinačno u kavezu, ali je prihvatljivo i čuvanje u malim grupama.

**1.5.3. Priprema životinja**

Koriste se zdrave životinje koje su se tokom najmanje pet dana privikle na laboratorijske uslove i koje ranije nisu bile podvrgnute eksperimentalnim postupcima. Eksperimentalne životinje se označavaju prema vrsti, varijetetu, izvoru, polu, telesnoj masi i/ili starosti. Životinje svih eksperimentalnih grupa su jednake telesne mase i starosti, koliko god je izvodljivo. Za svaki dozni nivo koriste se mlade odrasle ženke koje nisu ranije rađale. Ženke se pare s mužjacima iste vrste i varijeteta, a parenje između brata i sestre se izbegava. Za glodare je nulti dan gestacije dan kad se opazi vaginalni čep i/ili sperma. Za kuniće je nulti dan obično dan koitusa ili veštačke oplodnje, ukoliko se koristi ova tehnika. Parene ženke dodeljuju se slučajnim izborom kontrolnim grupama ili grupama koje se tretiraju. Kavezi se postavljaju tako da se pojava mogućih efekata zbog položaja kaveza svede na minimum. Svakoj životinji se dodeljuje jedinstveni identifikacijoni broj. Parene ženke se slučajnim izborom dodeljuju kontrolnim grupama ili grupama koje se tretiraju, a ako su se ženke parile u gomili, životinje iz svake gomile podjednako se raspodeljuju po grupama. Ženke koje je oplodio isti mužjak se raspodeljuju po grupama.

*1.6. POSTUPAK*

**1.6.1. Broj i pol životinja**

Svaka tretirana i kontrolna grupa sadrži dovoljan broj ženki, tako da se na postmortalnom pregledu nađe oko 20 ženki sa implantima. Grupe sa manje od 16 životinja sa implantima mogu da budu neodgovarajuće. Studija se ne odbacuje obavezno zbog mortaliteta majki, ako se obezbedi da mortalitet ne prelazi približno 10%.

**1.6.2. Priprema doza**

Ako se za lakše doziranje koristi pomoćno sredstvo ili drugi aditiv, uzimaju se u obzir sledeće karakteristike: efekti na apsorpciju, raspodelu, metabolizam i zadržavanje ili izlučivanje ispitivane supstance; efekti na hemijska svojstva ispitivane supstance koja mogu izmeniti njene toksikološke karakteristike; efekti na potrošnju hrane ili vode ili ishranjenost životinja. Pomoćno sredstvo ne sme da bude toksično po rast i razvoj, niti sme da ima efekte na reprodukciju.

**1.6.3. Doziranje**

Obično se ispitivana supstanca daje svakodnevno od implantacije (npr. peti dan posle parenja) do dana pre planiranog carskog reza. Ako preliminarne studije, kada su dostupne, ne upućuju na visoku opasnost od preimplantacionog gubitka, tretman se može produžiti toliko da obuhvati čitav period gestacije, od parenja do dana pre planiranog lišavanja života na human način. Dobro je poznato da neodgovarajuća manipulacija ili stres tokom trudnoće mogu da uzrokuju prenatalni gubitak. Radi čuvanja od prenatalnog gubitka zbog faktora koji nisu u vezi sa tretmanom, izbegava se nepotrebna manipulacija skotnim životinjama, kao i stres zbog spoljašnjih faktora kao što je buka.

Koriste se najmanje tri nivoa doze i istovremena kontrola. Zdrave životinje dodeljuju se kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju slučajnim izborom. Dozni nivoi se dovoljno razlikuju kako bi proizvele gradaciju toksičnih efekta. Osim ako ne postoji ograničenje zbog fizičke/hemijske prirode ili bioloških svojstava ispitivane supstance, najviša doza se određuje s ciljem da izazove određenu toksičnost po rast i razvoj i/ili po majku (klinički znaci ili smanjenje telesne mase), ali ne smrt ili tešku patnju. Najmanje jedan srednji dozni nivo proizvodi minimalne primetne toksične efekte. Najniži dozni nivo ne sme da izazove nikakav dokaz toksičnosti niti po majku niti po rast i razvoj. Opadajući niz nivoa doza bira se u cilju dokazivanja neke reakcije koja je zavisna od doziranja i nivoa pri kome nije opažen štetni efekat (NOAEL). Za određivanje opadajućih nivoa doza obično su optimalni dvostruki do četvorostruki intervali, a često se preporučuje četvrta eksperimentalna grupa umesto primene vrlo velikih intervala između doza (npr. više od faktora 10). Iako je cilj utvrđivanje NOAEL-a majke, mogu se prihvatiti i studije koje ne utvrđuju ovaj nivo**1**.

Dozni nivoi biraju se uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti, kao i dodatne podatke o metabolizmu i toksikokinetici ispitivane supstance ili srodnih materijala. Ovi podaci pomažu i kod dokazivanja adekvatnosti režima doziranja.

Koristi se i istovremena kontrolna grupa. Ova grupa mora da bude prividno tretirana kontrolna grupa ili kontrolna grupa za pomoćno sredstvo, ako se ono koristi prilikom primene ispitivane supstance. Svim grupama daje se ista zapremina ili ispitivane supstance ili pomoćnog sredstva. Sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao sa onima u eksperimentalnim grupama. Kontrolne grupe pomoćnog sredstva dobijaju pomoćnu materiju u najvećoj količini koja se koristi (kao kod grupa koje se tretiraju najnižim koncentracijama).

**1.6.4. Ispitivanje granične doze**

Ako ispitivanje na jednom nivou doze od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan primenjene oralno uz korišćenje postupaka opisanih u ovoj studiji ne proizvede primetnu toksičnost kod gravidnih životinja ili kod njihovog potomstva i ako se efekat na osnovu postojećih podataka (npr. iz jedinjenja koja su strukturno i/ili metabolički slična) ne očekuje, nije potrebna potpuna studija uz korišćenje tri nivoa doze. Očekivana izloženost ljudi može da ukaže na potrebu da se u ispitivanju granične doze koristi viša oralna doza. Za druge vrste primene, kao što su inhalacija ili dermalna primena, fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance često mogu indikovati i ograničiti nivo izlaganja koji se maksimalno može postići (na primer dermalna aplikacija ne sme da uzrokuje izraženu lokalnu toksičnost).

**1.6.5. Primena doza**

Ispitivana supstanca ili pomoćno sredstvo obično se daje oralno intubacijom. Ako se koristi drugi put primene, lice koja obavlja ispitivanje opravdava i obrazlaže svoj izbor i verovatno su neophodne odgovarajuće izmene**2, 3, 4**. Ispitivana supstanca se primenjuje u približno isto vreme svakog dana.

Doza za pojedinačne životinje zasniva se na poslednjoj određenoj individualnoj telesnoj masi. Potreban je oprez kod prilagođavanja doze tokom poslednjeg trimestra trudnoće. Prilikom izbora doze koriste se postojeći podaci kako bi se sprečila prekomerna toksičnost po majku. Ako se registruje prekomerna toksičnost kod tretiranih (gravidnih) ženki, te životinje se humano lišavaju života. Ako nekoliko gravidnih životinja pokaže znake prekomerne toksičnosti, razmatra se završetak (lišavanje života na human način) te dozne grupe. Ako se supstanca primenjuje oralnom sondom, preporučuje se da se životinjama daje u jednoj dozi upotrebom želudačne cevi ili odgovarajuće intubacione kanile. Maksimalna zapremina tečnosti koju je dozvoljeno dati odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme biti veća od 1 ml/100 g TM, osim u slučaju vodenih rastvora gde se može koristiti 2 ml/100 g TM. Ako se kao pomoćno sredstvo koristi kukuruzno ulje zapremina ne sme da bude veća od 0,4 ml/100 g TM. Varijabilnost u zapremini koja se ispituje svodi se na minimum prilagođavanjem koncentracija kako bi se obezbedila stalna zapremina kod svih doznih nivoa.

**1.6.6. Posmatranje (gravidnih) ženki**

Klinička posmatranja obavljaju se i beleže najmanje jednom dnevno, ako je moguće u isto vreme svakog dana, uzimajući u obzir glavni period tokom koga se javljaju predviđeni efekti posle primene doze. Beleže se stanja životinja, uključujući smrtnost, stanje pred smrt, bitne promene ponašanja i svi znaci očigledne toksičnosti.

**1.6.7. Telesna masa i potrošnja hrane**

Životinje se mere: nultog dana gestacije i najkasnije trećeg dana gestacije ako je parene životinje nabavio spoljni uzgajivač; prvog dana doziranja; najmanje svaka tri dana tokom perioda doziranja i na dan planiranog lišavanja života na human način.

Potrošnja hrane se beleži svaka tri dana i podudara se sa danima određivanja telesne mase.

**1.6.8. Postmortalni pregled**

Ženke se lišavaju života na human način jedan dan pre očekivanog dana porođaja. Ženke koje pokazuju znake pobačaja ili prevremenog porođaja lišavaju se života i podvrgavaju detaljnom makroskopskom pregledu pre planiranog lišavanja života.

Za vreme lišavanja života na human način ili u slučaju smrti tokom studije, ženka se makroskopski pregleda u cilju otkrivanja bilo koje strukturalne abnormalnosti ili patološke promene. Procena ženki za vreme carskog reza i kasnija analiza ploda obavlja se obično bez poznavanja podataka o tretiranoj grupi kako bi se greške svele na minimum.

**1.6.9. Pregled sadržaja materice**

Odmah po lišavanju života na human način ili što pre nakon smrti, uzimaju se materice i proverava stanje trudnoće životinja. Materice koje nisu gravidne potrebno je dalje pregledati (npr. bojenjem amonijum sulfidom za glodare i Salewski bojenjem ili odgovarajućom alternativnom metodom za kuniće) kako bi se potvrdilo da ne postoji trudnoća**5**.

Meri se masa gravidne materice sa cerviksom. Kod životinja koje su nađene mrtve tokom studije ne mere se mase gravidnih materica.

Za gravidne životinje određuje se broj žutih tela.

Sadržaji materica pregledaju se kako bi se utvrdio broj smrti embriona ili ploda i plodova koji su sposobni za život. Opisuje se stepen resorpcije kako bi se procenilo relativno vreme smrti zametka (videti odeljak 1.2. ove metode).

**1.6.10. Pregled ploda**

Određuje se pol i telesna masa svakog ploda. Svaki plod se pregleda kako bi se utvrdile spoljašnje promene**6**.

Plodovi se pregledaju na izmene kostura i mekih tkiva (npr. varijacije i malformacije ili anomalije)**7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24**. Kategorizacija fetalnih promena se preporučuje, ali nije obavezna. Ako se obavi kategorizacija, jasno se navode kriterijumi za određivanje svake kategorije. Posebna pažnja se obraća na reproduktivni trakt koji se pregleda na znakove izmenjenog rasta i razvoja.

Za glodare, oko jedne polovine svakog okota priprema se i pregleda promene na kosturu. Preostale životinje iz okota pripremaju se i pregledaju na promene u mekim tkivima korišćenjem prihvaćenih ili odgovarajućih metoda serijske sekcije ili pažljive tehnike seciranja.

Kod životinja koje nisu glodari, npr. kunića, svi plodovi se pregledaju na promene u mekim tkivima i kosturu. Tela tih plodova procenjuju se pažljivim seciranjem i traženjem promena na mekim tkivima, što može da obuhvati postupke za dalju procenu interne kardijalne strukture**25**. Glave jedne polovine plodova pregledane na taj način uklanjaju se i obrađuju za procenu promena na mekim tkivima (uključujući oči, mozak, nazalne šupljine i jezik) korišćenjem standardnih metoda serijske sekcije**26** ili neke podjednako osetljive metode. Tela tih plodova i preostali nedirnuti plodovi obrađuju se i pregledaju na promene na kosturu, koristeći iste metode kao što je opisano za glodare.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci se navode pojedinačno za ženke, kao i za njihove potomke i prikazuju tabelarno. Podaci se navode za svaku eksperimentalnu grupu i generaciju i to: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su nađene mrtve za vreme ispitivanja ili su lišene života iz humanih razloga, vreme svake smrti ili humanog lišenja života, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis znakova uočene toksičnosti, uključujući vreme pojave, trajanja i težine svakog toksičnog efekta, vrste primećenih pojava koje embriona/ploda i sve relevantne podatke o okotu.

Numerički podaci se procenjuju odgovarajućom statističkom metodom, uz uzimanje okota kao jedinice za analizu podataka. Koristi se opšteprihvaćena statistička metoda. Statističke metode se biraju prilikom planiranja ispitivanja i one se moraju opravdati. U izveštaju o ispitivanju navode se i podaci o životinjama koje nisu preživele do planiranog lišavanja života na human način. Ako je relevantno ovi podaci se mogu uključiti u srednje vrednosti za grupe. Relevantnost podataka dobijenih od takvih životinja, pa i uključivanje ili isključenje iz srednjih vrednosti grupe, opravdava se i procenjuje na individualnoj osnovi.

*2.2. PROCENA REZULTATA*

Nalazi ispitivanja toksičnosti po prenatalni rast i razvoj procenjuju se u smislu primećenih efekata. Procena obuhvata:

- rezultate ispitivanja majke i embriona/ploda, uključujući procenu odnosa ili njihovo odsustvo, između izlaganja životinja ispitivanoj supstanci i učestalosti i ozbiljnosti svih nalaza;

- kriterijume korišćene za kategorizaciju spoljnog izgleda ploda, promena mekog tkiva i kostura, ako je obavljena kategorizacija;

- kad odgovara, kontrolne podatke iz ranije studije kako bi se poboljšalo tumačenje rezultata ispitivanja;

- numeričke vrednosti korišćene za izračunavanje svih procenata ili indeksa;

- odgovarajuću statističku analizu nalaza ispitivanja, gde odgovara, koja obuhvata podatke o metodi analize, tako da nezavisni analitičar/statističar može da reevaluira i rekonstruiše analizu.

U svakoj studiji koja pokazuje odsustvo bilo kakvih toksičnih efekata razmatraju se dalja istraživanja kako bi se utvrdila apsorpcija i bioraspoloživost ispitivane supstance.

*2.3. TUMAČENJE REZULTATA*

Ispitivanje toksičnosti po prenatalni rast i razvoj daje podatke o efektima ponavljanog izlaganja supstanci tokom graviditeta na ženke i na intrauterini razvoj njihovih potomaka. Rezultati ispitivanja tumače se u vezi sa nalazima iz subhronične, reproduktivne, toksikokinetičke i drugih studija. Kako je naglasak stavljen i na opštu toksičnost u smislu toksičnosti po majku i na pokazatelje toksičnosti po rast i razvoj, rezultati ispitivanja dozvoljavaju u određenoj meri razlikovanje između efekata na rast i razvoj do kojih dolazi u odsustvu opšte toksičnosti i onih efekata koji su indukovani samo pri nivoima koji su toksični i za gravidne životinje**27**.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i, gde je neophodno, fizička i hemijska svojstva;

- identifikacija uključujući CAS broj ako je poznat/utvrđen;

- čistoću.

2) Pomoćnom sredstvu (ako se koristi):

- opravdanje za izbor pomoćnog sredstva, ako se ne radi o vodi.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta i varijetet;

- broj i starost životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, dijeta itd.;

- individualne telesne mase životinja na početku ispitivanja.

4) Eksperimentalnim uslovima:

- obrazloženje za izbor nivoa doze;

- pojedinosti o formulaciji ispitivane supstance/priprema hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;

- pojedinosti o primeni ispitivane supstance;

- konverzija koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do stvarne doze (mg/kg TM/dan), ako je primenljivo;

- uslovi životne sredine;

- podaci o kvalitetu hrane i vode.

5) Rezultatima:

- Podaci o toksičnoj reakciji kod majke, uključuju, ali nisu ograničeni na:

- broj životinja na početku ispitivanja, broj preživelih životinja, broj gravidnih ženki i broj pobačaja i broj životinja koje su se prevremeno okotile;

- datum smrti tokom studije ili da li su životinje preživele do lišavanja života na human način;

- podatke o životinjama koje nisu preživele do planiranog lišavanja života na human način, ali se ne uključuju u statističko poređenje između grupa;

- datum uočavanja svakog abnormalnog kliničkog znaka i kasniji tok;

- telesna masa, promene telesne mase i masa gravidne materice, uključujući, po izboru, promenu telesne mase korigovane za težinu gravidne materice;

- potrošnja hrane i, ako je merena, potrošnja vode;

- nalazi obdukcije, uključujući težinu materice;

- NOAEL vrednosti za efekte na majku i rast i razvoj.

6) Krajnjim pokazateljima efekta na rast i razvoj po dozi za okot sa implantima, uključujući:

- broj žutih tela;

- broj implantacija, broj i procenat živih i mrtvih plodova i resorpcija;

- broj i procenat pred- i postimplantaciionih gubitaka.

7) Krajnjim pokazateljima efekta na rast i razvoj po dozi za okote sa živim plodovima, uključujući:

- broj i procenat živih potomaka;

- odnos polova;

- telesna masa, najbolje po polu i sa kombinovanim polovima;

- malformacije spoljnog izgleda, mekih tkiva i kostura i druge relevantne promene;

- kriterijumi za kategorizaciju, ako odgovara;

- ukupan broj i procenat plodova i okota sa spoljašnjim promenama, promenama mekog tkiva ili kostura, kao i vrsta i incidenca individualnih anomalija i drugih relevantnih promena.

8) Obrazloženju rezultata.

9) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Analysis 16; 399-410.

2. Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicology 14; 386-398.

3. Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; 1-8.

4. US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie 247:367.

6. Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7. Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congenital Anomalies 16; 171-173.

8. Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32; :381-391.

9. Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47:229-242.

10. Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

11.Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127:291-306.

12. Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

13. Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; :398-408.

14. Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations Teratology 8; 309-316.

15. Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46; 169-181.

16. Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.

17. Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy 41; 411-445.

18. Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Stain Technology 39; 61-63.

19. Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy 36; 313-355.

20. Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 4; 181-188.

21. Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.

22. Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

23. Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

24. Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28; 233-239.

25. Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 37-38.

26. Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

27. US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register 56; 63798-63826.

28. Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

**B.32. ISPITIVANJE KARCINOGENOSTI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Obično se ispitivana supstanca primenjuje odgovarajućim putem sedam dana nedeljno kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, jedna doza po grupi, tokom većeg dela njihovog životnog veka. Za vreme i posle izlaganja ispitivanoj supstanci eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju kako bi se otkrili znakovi toksičnosti, naročito razvoj tumora.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

Eksperimentalne životinje drže se pod eksperimentalnim uslovima čuvanja i hranjenja najmanje pet dana pre ispitivanja. Zdrave mlade životinje pre ispitivanja se slučajnim izborom raspoređuju u tretirane i kontrolne grupe.

**1.6.1. Pripreme**

*1.6.1.1. Eksperimentalne životinje*

Na osnovu rezultata prethodnih studija mogu se koristiti različite vrste životinja (glodari ili drugi). Ispitivanju se podvrgavaju zdravi mladi primerci životinja laboratorijskih vrsta koje se najčešće koriste u ovakvim eksperimentima, a davanje doze započinje u što kraćem vremenskom roku posle odbijanja od sise.

Varijacije u telesnoj masi korišćenih životinja na početku studije ne smeju biti veće od ± 20% srednje vrednosti. Ako se izvodi subhronična oralna studija kao uvod u dugoročnu studiju u obe studije se koriste iste vrste i sojevi životinja.

*1.6.1.2. Broj i pol*

Za glodare koristi se najmanje 100 životinja (50 ženki i 50 mužjaka) za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu. Uzimaju se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju lišavanja života na human način u toku eksperimenta broj životinja se povećava za broj životinja koje su planirane za lišavanje života pre završetka ispitivanja.

*1.6.1.3. Dozni nivoi i učestalost izlaganja*

Koriste se najmanje tri doze ispitivane supstance uz istovremenu kontrolu. Najviša doza pokazuje znake minimalne toksičnosti, kao što je blago smanjenje dobijanja na telesnoj masi (manje od 10%), bez bitne promene normalnog životnog veka zbog efekata, osim kad se radi o tumorima.

Najniža doza ne sme da utiče na normalni rast, razvoj i dužinu života životinja niti da da bilo kakvu naznaku toksičnosti. Najniža doza ne sme da bude niža od 10% od visoke doze.

Srednja doza utvrđuje se u sredini raspona između visokih i niskih doza.

Kod izbora visine doza uzimaju se u obzir podaci iz prethodnih ispitivanja toksičnosti i studija.

Životinje se obično svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili se umeša u hranu, neprekidno je na raspolaganju.

*1.6.1.4. Kontrole*

Istovremeno se koristi kontrolna grupa koja je u svakom pogledu ista kao eksperimentalne grupe, osim izlaganja ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima kao što su inhalacione studije koje uključuju aerosole ili korišćenje emulgatora čija biološka aktivnost nije okarakterisana u oralnim studijama, istovremeno se koristi i dodatna kontrolna grupa koja se ne izlaže pomoćnom sredstvu.

*1.6.1.5. Put primene*

Tri glavna puta primene su: peroralni, dermalni i inhalacioni. Izbor puta primene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i mogućeg puta izlaganja kod ljudi.

*1.6.1.6. Studije sa peroralnim putem primene*

Kad se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i ako je to put kojim ljudi mogu biti izloženi, predlaže se peroralni način primene, osim ako postoje kontraindikacije. Životinje mogu da dobiju ispitivanu supstancu u hrani, rastvorenu u vodi za piće ili im se može davati u kapsulama.

Idealno je dnevno doziranje tokom sedam dana nedeljno, jer primena doze na bazi pet dana nedeljno može da omogući oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu u kome se ne primenjuje ispitivana supstanca i time da utiče na rezultat i kasniju procenu. Doziranje na bazi pet dana nedeljno smatra se prihvatljivim.

*1.6.1.7. Studije sa dermalnim putem primene*

Kutano izlaganje premazivanjem kože može se izabrati da simulira glavni put izlaganja ljudi i kao sistem - model za izazivanje lezija na koži.

*1.6.1.8. Studije sa inhalacionim putem primene*

Kako studije sa inhalacionim putem primene predstavljaju tehnički problem koji je složeniji od drugih načina primene, ovde se detaljnije navodi taj način davanja. Dobra alternativa u specifičnim slučajevima može biti intratrahealno ukapavanje.

Dugotrajna izlaganja se osmišljavaju po projektovanoj izloženosti ljudi, pa se životinje dnevno izlažu šest sati posle izjednačenja koncentracija u komori, pet dana u nedelji (isprekidana izloženost) ili, kod eventualne ambijentalne izloženosti, 22 do 24 sata izloženosti tokom sedam dana nedeljno (neprekidna izloženost) sa oko jednim satom dnevno za hranjenje životinja u slično vreme i za održavanje komore. U oba slučaja životinje se izlažu fiksnim koncentracijama ispitivane supstance.

Glavna razlika između isprekidane i neprekidne izloženosti je u tome što u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom koga se životinje mogu oporaviti od efekata pojedinačne dnevne izloženosti, sa čak i dužim vremenom oporavka tokom vikenda.

Izbor isprekidane ili neprekidne izloženosti zavisi od ciljeva ispitivanja i od simulirane izloženosti ljudi. Razmatraju se određeni tehnički problemi. Na primer, prednosti neprekidne izloženosti za simuliranje uslova životne sredine mogu da deluju suprotno zbog potrebe davanja vode i hranjenja za vreme izloženosti i potrebe za složenijim (i pouzdanim) tehnikama za stvaranje i praćenje aerosola i pare.

*1.6.1.9. Komore za izlaganje*

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionim komorama dizajniranim tako da održavaju dinamičan protok vazduha s najmanje 12 izmena vazduha u jednom satu kako bi se obezbedio odgovarajući sadržaj kiseonika i ravnomerno raspoređena atmosfera. Kontrolne komore i komore za izlaganje su jednake u konstrukciji i dizajnirane tako da obezbeđuju uslove izlaganja koji su uporedivi u svim pogledima, izuzev izloženosti ispitivanoj supstanci. U komori se održava blagi negativni pritisak zbog sprečavanja ispuštanja ispitivane supstance u okruženje. Komore smanjuju na minimum prenaseljenost eksperimentalnih životinja. Kako bi se obezbedila stabilnost atmosfere u komori, pravilo je da ukupna "zapremina" eksperimentalnih životinja ne prelazi 5% zapremine komore.

Mere se i prate sledeći parametri:

a) Protok vazduha: preporučuje se da se brzina protoka vazduha kroz komoru neprestano prati;

b) Koncentracija: u periodu dnevnog izlaganja koncentracija ispitivane supstance ne sme da varira za više od ± 15% od srednje vrednosti. Tokom celog ispitivanja koncentracije iz dana u dan održavaju se što je moguće stalnijim;

v) Temperatura i vlaga: za glodare se temperatura održava na 22° C ± 2° C, a vlaga u komori na 30% do 70%, osim ako se koristi voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Preporučuje se da se temperatura i vlažnost neprestano prate;

g) Merenja veličine čestica: raspodela veličine čestica određuje se u atmosferi komore koja sadrži tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su takve veličine da ih eksperimentalne životinje mogu udisati. Uzorci atmosfere komore uzimaju se u zoni disanja životinja. Uzorak vazduha je reprezentativan za raspodelu čestica kojima su životinje izložene i obuhvata, na gravimetrijskoj bazi, sav suspendovani aerosol, čak i ako se ne može udisati mnogo aerosola. Za vreme razvoja generišućeg sistema, često se obavljaju analize veličine čestica, kako bi se obezbedila stabilnost aerosola, a posle toga onoliko često koliko je potrebno tokom izlaganja, kako bi se pravilno odredila raspodela čestica kojima su životinje bile izložene.

*1.6.1.10. Trajanje ispitivanja*

Trajanje ispitivanja karcinogenosti obuhvata veći deo životnog veka eksperimentalnih životinja. Ispitivanje se završava posle 18 meseci za miševe i hrčke, a posle 24 meseca za pacove. Za određene vrste životinja s dužim životnim vekom i/ili niskom stopom spontane pojave tumora ispitivanje se završava posle 24 meseca za miševe i hrčke, a posle 30 meseci za pacove. Alternativno je prihvatljiv završetak takve produžene studije kada broj preživelih životinja s najnižom dozom ili kontrolna grupa dostigne 25%. Kod završetka ispitivanja u kome je vidljiva razlika između polova, svaki pol se posebno razmatra. Ako zbog vidljive toksičnosti prevremeno ugine samo grupa izložena visokoj dozi, to ne mora da bude razlog za završetak ispitivanja, ako toksične manifestacije ne uzrokuju probleme u ostalim grupama. Kako bi se prihvatio negativan rezultat, najviše 10% životinja od bilo koje grupe može da se izgubi zbog autolize, kanibalizma ili problema usled manipulacije, a preživljavanje u svim grupama treba da bude veće od 50% posle 18 meseci za miševe i hrčke, a posle 24 meseca za pacove.

**1.6.2. Postupak**

*1.6.2.1. Posmatranja*

Dnevna posmatranja životinja u kavezu obuhvataju promene na koži i krznu, očima i sluznicama, kao i respiratornom, cirkulatornom sistemu i autonomnom i centralnom nervnom sistemu, somatomotornu aktivnost i model ponašanja.

Neophodno je redovno posmatrati životinje kako bi se obezbedilo, koliko je moguće, da se životinje ne izgube iz studije zbog kanibalizma, aotolize tkiva ili stavljanja na pogrešno mesto. Kada se primete životinje na samrti, one se izoluju i obdukuju.

Klinički znaci i mortalitet se beleže za sve životinje. Posebna pažnja se obraća na razvoj tumora: potrebno je zabeležiti vreme pojave; lokaciju, dimenzije, izgled i rast svakog golim okom vidljivog tumora ili tumora koji se palpira.

Merenja potrošnje hrane (i vode, ako se ispitivana supstanca daje u vodi za piće) obavljaju se jednom nedeljno tokom prvih 13 nedelja ispitivanja, a potom u intervalima od oko tri meseca, osim ako zdravstveno stanje ili promene telesne mase ne zahtevaju drugačije.

Telesna masa se beleži pojedinačno za sve životinje jednom nedeljno tokom prvih 13 nedelja ispitivanja, a posle toga najmanje na svake četiri nedelje.

*1.6.2.2. Klinička ispitivanja*

1.6.2.2.1. Hematologija

Ako se posmatranjem životinja u kavezima primeti pogoršanje zdravlja tokom studije, za sve životinje kod kojih je primećeno pogoršanje radi se diferencijalna krvna slika.

Posle 12 meseci, 18 meseci i pre lišavanja života na human način, od životinja se uzima uzorak krvi. Diferencijalna krvna slika radi se u uzorcima životinja iz grupe kojoj je davana visoka doza i životinja u kontrolnim grupama. Ako ti podaci, naročito oni dobijeni pre lišavanja života na human način ili podaci patološkog pregleda, ukažu na potrebu izrade diferencijalne krvne slike, ista se radi i u grupi s narednom nižom dozom.

1.6.2.2.2. Postmortalni pregled

Postmortalni pregled se izvodi na svim životinjama, uključujući one koje su uginule za vreme eksperimenta ili su lišene života na human način jer su nađene na samrti. Čuvaju se sve vidljive lezije, tumori ili lezije za koje se sumnja da su tumori.

U odgovarajućem medijumu za eventualni kasniji histopatološki pregled čuvaju se sledeći organi i tkiva: mozak (uključujući delove produžene moždine/ponsa, kore malog mozga, kore velikog mozga), hipofiza, tiroidna/paratiroidna žlezda, timusna tkiva, dušnik i pluća, srce, aorta, pljuvačne žlezde, jetra, slezina, bubrezi, nadbubrežne žlezde, gušterača, polne žlezde, materica, ostali genitalni organi, koža, jednjak, želudac, dvanaestopalačno crevo, tanko crevo, slepo crevo, debelo crevo, rektum, mokraćna bešika, reprezentativan limfni čvor, ženske mlečne žlezde, muskulatura bedra, periferni živci, grudna kost sa kostnom srži, femur (uključujući zglob), kičmena moždina na tri nivoa (cervikalna, srednje-torakalna i lumbalna) i oči.

Inflacija (naduvavanje) pluća i mokraćne bešike s fiksativom je optimalan način da se sačuvaju ta tkiva. Inflacija pluća kod inhalacionih studija je suštinska za odgovarajući histopatološki pregled. Kod inhalacionih studija čuva se čitav respiratorni trakt, uključujući nosnu šupljinu, ždrelo i grkljan.

1.6.2.2.3. Histopatologija

a) Kompletna histopatološka ispitivanja se obavljaju na organima i tkivima svih životinja koje su uginule ili su lišene života na human način tokom ispitivanja i u kontrolnoj grupi i grupi kojoj je davana visoka doza.

b) U svim grupama mikroskopski se pregledaju svi tumori vidljivi golim okom ili lezije za koje se sumnja da bi mogli biti tumori.

v) Ako postoji značajna razlika u incidenci neoplastičkih lezija u grupi kojoj je davana visoka doza i u kontrolnoj grupi, histopatološki pregledi na tim organima ili tkivima izvode se i u drugim grupama.

g) Ako je preživljavanje u grupi kojoj je davana visoka doza bitno manje nego u kontrolnoj grupi, obavlja se kompletno ispitivanje grupe naredne niže doze.

d) Ako u grupi kojoj je davana visoka doza postoji dokaz o izazivanju toksičnih ili drugih efekata koji su mogli uticati na neoplastičnu reakciju, obavlja se kompletno ispitivanje životinja u grupi s narednom nižom dozom.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno, gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi: broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja s tumorima otkrivenim tokom eksperimenta, vreme otkrivanja i broj životinja kod kojih je nađen tumor posle lišavanja života na human način. Svi dobijeni rezultati analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Može se koristiti bilo koja usvojena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

1) Vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani;

2) Eksperimentalnim uslovima: opis aparature za izlaganje (uključujući dizajn, vrstu, dimenzije aparature, kao i izvor vazduha, sistem za generisanje partikulata i aerosola, metoda za kondicioniranje vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i metoda čuvanja životinja u eksperimentalnoj komori, ako se koristi. Opisuje se oprema za merenje temperature, vlažnosti i, kada odgovara, stabilnost koncentracije aerosola ili veličinu čestica).

3) Izlaganju:

- ovi podaci se prikazuju tabelarno sa srednjim vrednostima i merom varijabilnosti (npr. standardna devijacija) i obuhvataju podatke o:

a) brzini protoka vazduha kroz opremu za inhalaciju;

b) temperaturi i vlažnosti vazduha;

v) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi kroz opremu za inhalaciju, podeljenom sa zapreminom vazduha);

g) prirodi pomoćnog sredstva, ako je korišćeno;

d) koncentraciji supstance u zoni udisanja;

đ) srednjoj veličini čestica (gde je potrebno),

- nivoima doze (uključujući pomoćno sredstvo, ako je korišćeno) i koncentracije;

- o incidencama tumora po polu, dozi i vrsti tumora;

- vremenu smrti tokom ispitivanja ili da li su životinje preživele do žrtvovanja;

- o toksičnom odgovoru po polu i dozi;

- opis toksičnih ili drugih efekata;

- vremenu kada je primećen svaki znak abnormalnosti i njenom kasnijem toku;

- hrani i telesnoj masi;

- izvedenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima istih;

- nalazima obdukcije;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- statističkoj obradi rezultata s opisom korišćene metode.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.33. KOMBINOVANO ISPITIVANJE HRONIČNE TOKSIČNOSTI/KARCINOGENOSTI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Cilj kombinovanog ispitivanja hronične toksičnosti karcinogenosti jeste određivanje hroničnih i karcinogenih efekata supstance kod sisara posle produžene izloženosti.

U tu svrhu u ispitivanje karcinogenosti se dodatno uključuje najmanje jedna prateća grupa i kontrolna prateća grupa. Doza koja se koristi kod prateće grupe sa visokom dozom može da bude veća od one koja se koristi kod grupe sa visokom dozom u ispitivanju karcinogenosti. Životinje se u ispitivanju karcinogenosti pregledaju kako bi se uočila opšta toksičnost, kao i karcinogeni odgovor. Životinje iz tretirane prateće grupe pregledaju se na opštu toksičnost.

Ispitivanom supstancom više grupa eksperimentalnih životinja tretira se sedam dana nedeljno, odgovarajućim putem, jednom dozom po grupi i to tokom najvećeg dela njihovog života. Za vreme i posle izlaganja ispitivanoj supstanci, eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju radi otkrivanja znakova toksičnosti i razvoja tumora.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

Životinje se drže pod eksperimentalnim uslovima smeštaja i ishrane najmanje pet dana pre ispitivanja. Pre ispitivanja zdrave mlade životinje se slučajnim izborom dodeljuju grupama za tretiranje i kontrolnim grupama.

**1.6.1. Pripreme**

*1.6.1.1. Eksperimentalne životinje*

Najpogodnija vrsta je pacov. Na osnovu rezultata prethodnih ispitivanja mogu se koristiti i druge vrste (glodarske ili ne). Koriste se mlade i zdrave životinje uobičajeno korišćenih laboratorijskih linija. Sa doziranjem se počinje što je moguće pre nakon odbijanja od sise.

Na početku ispitivanja varijacija u telesnoj masi životinja ne treba da bude veća od ± 20% srednje vrednosti. Kada se pre dugoročnog ispitivanja izvodi ispitivanje subhronične oralne toksičnosti u oba ispitivanja se koriste iste vrste i sojevi/linije životinja.

*1.6.1.2. Broj i pol*

Za glodare je potrebno koristiti najmanje 100 životinja (50 ženki i 50 mužjaka) za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu. Koriste se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ukoliko se planira lišavanje života na human način u toku ispitivanja, potrebno je povećati broj životinja za onoliko koliko će biti lišeno života pre završetka ispitivanja.

Tretirana prateća grupa ili grupe za određivanje patologije različite od tumora obuhvataju po 20 životinja svakog pola, dok kontrolna prateća grupa obuhvata po 10 životinja svakog pola.

*1.6.1.3. Dozni nivoi i učestalost izlaganja*

U svrhu ispitivanja karcinogenosti potrebno je koristiti najmanje tri nivoa doza pored istovremene kontrolne grupe. Najveći dozni nivo izaziva znake minimalne toksičnosti, kao što je malo usporenje dobijanja na telesnoj masi (manje od 10%), a da se pri tome normalni životni vek ne menja bitno usled uzroka koji su drugačiji od pojave tumora.

Najmanji dozni nivo ne remeti normalni rast, razvoj i životni vek životinje, niti stvara ikakve naznake toksičnosti. Ovaj nivo nije niži od 10% visoke doze.

Srednja doza se ustanovljava na oko polovine raspona između visoke i niske doze.

Dozni nivoi se biraju uzimajući u obzir podatke iz prethodnih ispitivanja i studija toksičnosti.

U svrhu ispitivanja hronične toksičnosti u ispitivanje se uključuju dodatne prateće grupe - tretirane i istovremena kontrolna grupa. Visoka doza kod tretiranih pratećih životinja izaziva definitivne znake toksičnosti.

Učestalost izlaganja je svakodnevno. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili je umešana u hranu, potrebno je da voda i hrana budu stalno dostupne životinjama.

*1.6.1.4. Kontrole*

Koristi se istovremena grupa koja je u svakom pogledu identična tretiranim grupama, osim po izlaganju ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima, kao što je ispitivanje inhalacione toksičnosti koja uključuje aerosole ili upotreba emulgatora bez okarakterisanog biološkog dejstva u studijama oralne toksičnosti potrebno je koristiti dodatnu kontrolnu grupu koja nije izložena rastvaraču.

*1.6.1.5. Put primene*

Tri glavna puta primene su: peroralni, dermalni i inhalacioni. Izbor puta primene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i od mogućeg puta izlaganja kod ljudi.

*1.6.1.6. Ispitivanja peroralno*

Kada se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a to je i put unosa kojim mogu biti izloženi ljudi, ukoliko ne postoje kontraindikacije najbolje je primeniti peroralni put primene. Životinje ispitivanu supstancu mogu da dobijaju putem hrane, rastvorenu u vodi za piće ili u obliku kapsule. U idealnom slučaju se koristi dnevno doziranje sedam dana u nedelji, jer doziranje na bazi pet dana nedeljno može da omogući oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu bez doziranja, što može da utiče na rezultat i procenu. Na osnovu razmatranja praktičnosti, doziranje na bazi pet dana nedeljno smatra se prihvatljivim.

*1.6.1.7. Ispitivanja dermalnim putem primene*

Za simulaciju u slučaju kada je glavni put izloženosti ljudi preko kože i kao model za izazivanje povreda kože, može se izabrati izlaganje premazivanjem kože.

*1.6.1.8. Ispitivanja inhalacionim putem primene*

Ispitivanja inhalacionim putem primene predstavljaju složeniji tehnički problem od drugih puteva primene, te se iz tog razloga daju detaljnija uputstva o tom načinu. U posebnim slučajevima intratrahijalna instilacija može da predstavlja opravdanu alternativu.

Dugotrajna izlaganja se planiraju prema projektovanom izlaganju ljudi tako što se posle uravnoteženja koncentracija u komori životinje dnevno izlažu po šest sati, pet dana u nedelji (povremeno izlaganje) ili, u odnosu na moguće izlaganje u životnoj sredini, 22 do 24 sata dnevno sedam dana nedeljno (neprekidno izlaganje), sa jednim satom dnevno (u približno isto vreme) za hranjenje životinja i za održavanje komora. U oba slučaja životinje su izložene fiksnim koncentracijama ispitivane supstance. Glavna razlika između povremenog i neprekidnog izlaganja je da u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom kog se životinje mogu oporaviti od efekta dnevnog izlaganja, uz još duži period oporavka tokom vikenda.

Izbor povremenog ili neprekidnog izlaganja zavisi od ciljeva ispitivanja i od simuliranog izlaganja ljudi. U obzir se uzimaju određene tehničke poteškoće. Na primer, prednosti neprekidnog izlaganja za simulaciju uslova životne sredine mogu biti smanjene zbog potrebe pojenja i hranjenja za vreme izlaganja i zbog potrebe za komplikovanijim (i pouzdanijim) tehnikama produkcije aerosola i para, kao i zbog praćenja.

*1.6.1.9. Komore za inhalaciono izlaganje*

Životinje se ispituju u komorama za inhalaciono izlaganje koje su projektovane da podržavaju dinamički protok od najmanje 12 promena vazduha na sat kako bi se obezbedio adekvatan sadržaj kiseonika i ravnomerno raspoređena atmosfera izlaganja. Kontrolne komore i komore za izlaganje su identične konstrukcije i dizajna, kako bi se obezbedili uslovi izlaganja koji se u svim aspektima mogu uporediti, osim u pogledu izlaganja ispitivanim supstancama. U unutrašnjosti komore obično se održava negativni pritisak zbog sprečavanja ispuštanja ispitivane supstance u okolni prostor. Komore su takve da se gomilanje eksperimentalnih životinja svede na minimum. Opšte je pravilo da, zbog stabilnosti atmosfere u komori, ukupna zapremina životinja ne sme da prelazi 5% zapremine komore.

Mere se i prate sledeći parametri:

a) Protok vazduha: protok vazduha kroz komoru neprekidno se kontroliše;

b) Koncentracija: tokom dnevne izloženosti koncentracija ne sme da odstupa više od ± 15% od srednje vrednosti. Za vreme ukupnog trajanja ispitivanja, koncentracije se iz dana u dan održavaju što je moguće stabilnijim;

v) Temperatura i vlažnost: za glodare temperaturu se održava na 22° C ± 2° C, a vlažnost u komori na 30% do 70%, osim u slučaju kada se upotrebljava voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Preporučuje se neprekidno praćenje temperature i vlažnosti;

g) Merenja veličine čestica: raspodela veličine čestica određuje se u atmosferi komore kada ona uključuje tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su veličine koju eksperimentalna životinja može da udiše. Uzorci atmosfere iz komora uzimaju se u zoni udisanja. Uzorak vazduha je reprezentativan za raspodelu čestica kojima su životinje izložene i pruža gravimetrijski podatak o ukupnom aerosolu, čak i onda kada se veći deo aerosola ne udiše. Analize veličine čestica obavljaju se često tokom razvijanja generatorskog sistema kako bi se obezbedila stabilnost aerosola, a potom onoliko često koliko je potrebno da se adekvatno utvrdi konzistencija raspodele čestica kojima su životinje izložene.

*1.6.1.10. Trajanje ispitivanja*

Trajanje dela ispitivanja karcinogenosti podrazumeva najveći deo normalnog životnog veka eksperimentalnih životinja. Završetak ispitivanja u slučaju miševa i hrčaka je u 18 meseci starosti, a za pacove 24 meseca. Kod određenih sojeva životinja koje imaju duži životni vek i/ili nižu stopu spontane pojave tumora, završetak ispitivanja je 24 meseca za miševe i hrčke, a 30 meseci za pacove. Alternativno se može prihvatiti završetak takvog produženog ispitivanja kada broj preživelih u grupi sa najnižom dozom ili kontrolnoj grupi dostigne 25%. Ako se prilikom završetka ispitivanja uoče znatne razlike među polovima, svaki pol se odvojeno razmatra. Kad zbog očigledne toksičnosti pre vremena ugine samo grupa koja je primala visoku dozu, ispitivanje se ne prekida ukoliko toksičnost ne uzrokuje probleme u drugim grupama. Da bi se prihvatio negativni rezultat ispitivanja, ne sme biti izgubljeno više od 10% životinja u svakoj grupi zbog autolize, kanibalizma ili postupanja, a preživljavanje kod svih grupa ne sme da bude manje od 50% posle 18 meseci za miševe i hrčke, a posle 24 meseca za pacove.

Prateće grupe od 20 doziranih životinja po polu i 10 priključenih kontrolnih životinja po polu koje se koriste za ispitivanje hronične toksičnosti se na ispitivanju zadržavaju najmanje 12 meseci. Te životinje se lišavaju života na human način zbog ispitivanja patologije koja je u vezi sa ispitivanom supstancom, a koja nije dodatno zakomplikovana gerontološkim promenama.

**1.6.2. Postupak**

*1.6.2.1. Posmatranja*

Životinje u kavezima svakodnevno se posmatraju u pogledu promena na koži i krznu, očima i sluznicama, kao i disajnom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, promena somatomotornih aktivnosti i modela ponašanja.

Na životinjama u ispitivanim pratećim grupama u odgovarajućim intervalima se obavljaju klinički pregledi.

Redovno posmatranje životinja potrebno je zbog obezbeđivanja, koliko je moguće, da ne dođe do gubitka ispitivanih životinja zbog kanibalizma, autolize tkiva ili greškom. Životinje na samrti se odmah odvajaju i vrši se obdukcija.

Za sve životinje potrebno je zabeležiti kliničke znake, uključujući i neurološke i promene na oku i uginuća. Posebna pažnja se posvećuje razvoju tumora: vremenu nastanka, mestu, dimenzijama, izgledu i progresiji svakog vidljivog i opipljivog tumora. Potrebno je zabeležiti i vreme nastanka i progresiju toksičnih efekata.

Nedeljno se meri potrošnja hrane (i vode, kad se ispitivana supstanca daje putem vode za piće) tokom prvih 13 nedelja ispitivanja, a posle toga u intervalima od oko tri meseca, osim ako zdravstveno stanje ili promene telesne mase ne zahtevaju drugačije.

Telesna masa se beleži individualno za sve životinje, jednom nedeljno tokom prvih 13 nedelja perioda ispitivanja, a posle toga najmanje jednom u svake četiri nedelje.

*1.6.2.2. Klinički pregledi*

1.6.2.2.1. Hematologija

Hematološki pregled (tj. sadržaj hemoglobina, ukupna zapremina ćelija, ukupan broj crvenih krvnih ćelija, ukupan broj belih krvnih ćelija, krvnih pločica ili drugi parametri koagulabilnosti) se obavlja posle tri meseca, posle šest meseci, a posle toga u intervalima od oko šest meseci i na završetku ispitivanja na uzorcima krvi uzetih od 10 pacova po polu iz svih grupa. Ako je moguće, u svakom intervalu se uzimaju uzorci od istih pacova.

Ukoliko se tokom posmatranja utvrdi pogoršanje zdravstvenog stanja životinja, potrebno je uraditi diferencijalnu krvnu sliku odgovarajućih životinja.

Diferencijalna krvna slika vrši se na uzorcima životinja iz grupe s najvećom dozom i kontrolne grupe. Diferencijalna krvna slika vrši se na sledećoj nižoj grupi/grupama samo ako se utvrde značajne razlike između najviše grupe i kontrole ili ako je indikovano zbog patoloških nalaza.

1.6.2.2.2. Analiza mokraće

Za analizu se uzimaju uzorci mokraće od 10 pacova svakog pola iz svih grupa, ako je moguće od istih pacova, u istim intervalima kao i hematološki pregledi.

Za svaku pojedinu životinju ili na "pool" uzorku po polu po grupi glodara određuje se:

- izgled: zapremina i gustina po pojedinoj životinji;

- proteini, glukoza, keton, okultna krv (semi-kvantitativno);

- mikroskopski pregled sedimenata (semi-kvantitativno).

1.6.2.2.3. Medicinska biohemija

U intervalima od oko šest meseci i na završetku ispitivanja uzimaju se uzorci krvi od svih životinja koje nisu glodari za biohemijska merenja i 10 uzoraka od pacova po polu iz svih grupa, ako je moguće uvek od istih životinja. Potrebno je uzeti prethodne uzorke od životinja koje nisu glodari. U plazmi ovih uzoraka određuje se:

- koncentracija ukupnih proteina;

- koncentracija albumina;

- ispitivanja funkcije jetre (kao što su aktivnost alkalne fosfataze, aktivnost glutmat piruvat transaminaze**X** i aktivnost glutamat oksaloacetat transaminaze**XI**), gama glutamil transpeptidaza, ornitin dekarboksilaza;

- metabolizam ugljenih hidrata, kao što je glukoza u krvi posle gladovanja;

- ispitivanja funkcije bubrega kao što je azot u ureji u krvi (u daljem tekstu: BUN).

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**X** poznata kao serumska alanin aminotransferaza   
**XI** poznata kao serumska aspartat aminotransferaza

1.6.2.2.4. Postmortalni pregled

Kompletna obdukcija se izvodi na svim životinjama, uključujući i one koje su uginule tokom ispitivanja ili koje su lišene života na human način jer su nađene na samrti. Pre lišavanja života na human način potrebno je od svih životinja uzeti uzorke krvi za različite analize. Čuvaju se svi vidljivi tumori i ozlede za koje se sumnja da su tumori. Preduzimaju se sve mere za povezivanje uočenih promena s mikroskopskim nalazima.

Svi organi i tkiva se čuvaju za histopatološke preglede. To podrazumeva sledeće organe i tkiva: mozak**XII** (medula/pons, kora malog mozga, kora velikog mozga); hipofiza, tiroidea (uključujući paratiroideu), timus, pluća (uključujući traheju), srce, aortu, pljuvačne žlezde, jetru**XII**, slezinu, bubrege**XII**, nadbubrežne žlezde**XII**, jednjak, želudac, duodenum, jejenum, ileum, slepo crevo, kolon, rektum, mokraćna bešika, limfni čvorovi, pankreas, pollne žlezde**XII**, pomoćni genitalni organi; ženska mlečna žlezda, koža, muskulatura, periferni živci, kičma (cervikalna, torakalna, lumbalna), sternum sa koštanom srži i femur (sa zglobom) i oči.

Iako inflacija (naduvavanje) pluća i mokraćne bešike pomoću fiksativa predstavlja optimalni način za konzerviranje tih tkiva, u ispitivanjima inhalacione toksičnosti naduvavanje pluća je neophodno za odgovarajući histopatološki pregled. Kod specifičnih ispitivanja, kao što su ispitivanja inhalacione toksičnosti, potrebno je pregledati ceo respiratorni trakt, uključujući i nos, ždrelo i grkljan.

Ukoliko se obavljaju druga klinička ispitivanja, dobijeni podaci treba da budu dostupni pre mikroskopskog pregleda, jer patologu mogu dati značajne smernice.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XII** Meri se masa organima (uzetim od po 10 životinja po polu po grupi glodara)

1.6.2.2.5. Histopatologija

Za deo ispitivanja hronične toksičnosti:

Potrebno je detaljno pregledati sve sačuvane organe svih životinja iz prateće grupe visoke doze i iz kontrolne grupe. Ako se patološki nalaz uzorka iz prateće grupe visoke doze može povezati s ispitivanom supstancom, ciljni organi svih životinja iz ostalih tretiranih pratećih grupa se na kraju ispitivanja podvrgavaju potpunom i detaljnom histološkom pregledu, kao i oni iz pogođenih grupa iz dela ispitivanja karcinogenosti.

Za deo ispitivanja karcinogenosti:

a) Na organima i tkivima svih životinja koje su uginule ili bile lišene života na human način tokom ispitivanja, kao i svih životinja iz kontrolne grupe i grupe visoke doze obavlja se potpuni histopatološki pregled;

b) Svi tumori vidljivi golim okom ili promene za koje se sumnja da su tumori nađene kod svih grupa i na bilo kom organu pregledaju se mikroskopski;

v) Ukoliko postoji značajna razlika u učestalosti pojave neoplastičnih promena kod grupe visokog doznog nivoa i kontrolne grupe, potrebno je obaviti histopatološki pregled na određenom organu ili tkivu u drugim grupama;

g) Ako je preživljavanje kod grupe visokog doznog nivoa znatno manje nego u kontrolnoj grupi, potrebno je detaljno pregledati sledeću grupu sa nižim nivoom doze;

d) Ako kod grupe visokog doznog nivoa postoji dokaz o uzrokovanju toksičnosti ili o drugim efektima koji mogu da utiču na neoplastičnu reakciju, potrebno je detaljno pregledati grupu sledećeg nižeg doznog nivoa.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno i za svaku ispitivanu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja kod kojih su se pojavili tumori ili toksični efekti utvrđenih tokom ispitivanja, vreme otkrivanja i broj životinja kod kojih su tumori ustanovljeni po lišavanju života na human način. Rezultati se procenjuju odgovarajućom statističkom metodom. Može se primeniti bilo koja priznata statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

1) Vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani.

2) Uslovima ispitivanja: opis aparature za inhalaciono izlaganje (uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem generisanja čestica i aerosola, način klimatizovanja vazduha, tretman iskorišćenog vazduha i metoda smeštaja životinja u eksperimentalnim komorama, ako se primenjuju. Opisuje se uređaj za merenje temperature, vlažnosti i, kada odgovara, stabilnosti koncentracije aerosola i veličine čestica).

3) Izlaganju:

- ovi podaci se navode u obliku tabele u kojoj se prikazuju srednje vrednosti i mera odstupanja (tj. standardna devijacija) i uključuju:

a) podatke o protoku vazduha kroz opremu za inhalaciju;

b) temperaturu i vlažnost vazduha;

v) nominalne koncentracije (ukupna količine ispitivane supstance dodate u opremu za inhalaciju, podeljena sa zapreminom vazduha);

g) prirodu rastvarača, ako je korišćen;

d) koncentraciju u zoni udisanja;

đ) srednju veličina čestica (gde je primenljivo);

- doznim nivoima (uključujući rastvarač, ako se koristi) i koncentracije;

- učestalosti pojave tumora po polu, dozi i tipu tumora;

- vremenu smrti tokom ispitivanja ili da li su životinje preživele do kraja, uključujući prateću grupu;

- toksičnoj reakciji po polu i dozi;

- opis toksičnih ili drugih efekata;

- vremenu uočavanja svakog znaka abnormalnosti i njen dalji tok;

- oftalmološkim nalazima;

- hrani i telesnoj masi;

- primenjenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima;

- primenjenim medicinsko-biohemijskim ispitivanjima i svim rezultatima (uključujući i analizu urina);

- obdukcionim nalazima;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- statističkoj obradi rezultata sa opisom primenjenih metoda.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.34. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU NA JEDNOJ GENERACIJI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se u rastućim dozama u grupama mužjaka i ženki. Mužjacima se daje supstanca tokom rasta i tokom najmanje jednog spermatogenenog ciklusa (oko 56 dana kod miša, a 70 dana kod pacova) kako bi se izazvali štetni efekti supstance koja se ispituje na spermatogenezu.

Ženke roditeljske (P) generacije se doziraju tokom najmanje dva kompletna ciklusa "estrusa" kako bi se izazvali štetni efekti ispitivane supstance po "estrus". Posle toga se životinje pare. Ispitivana supstanca se primenjuje kod oba pola tokom perioda parenja, a posle toga samo ženkama tokom graviditeta i tokom perioda dojenja.

Za primenu inhalacionim putem metoda zahteva modifikaciju.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Pre ispitivanja zdrave mlade životinje se slučajnim izborom raspoređuju u tretirane i kontrolne grupe. Životinje se drže u uslovima eksperimentalnog smeštaja i ishrane najmanje pet dana pre ispitivanja.

Preporučuje se da se ispitivana supstanca daje u hrani ili vodi za piće. Prihvataju se i drugi putevi primene. Tokom odgovarajućeg eksperimentalnog perioda svim životinjama se daje supstancu na isti način. Ako se upotrebljava rastvarač ili aditivi da bi se olakšalo doziranje, oni ne smeju da izazivaju toksični efekat.

Doziranje je sedam dana nedeljno.

*1.6.1.1. Eksperimentalne životinje*

1.6.1.1.1. Izbor vrste

Preporučene vrste su pacovi ili miševi. Koriste se zdrave životinje koje ranije nisu bile podvrgnute ispitivanjima. Ne koriste se sojevi za koje se zna da su slabo plodni. Eksperimentalne životinje treba okarakterisati po vrsti, soju, polu, telesnoj masi i/ili starosti.

Za adekvatnu procenu plodnosti potrebno je posmatrati i mužjake i ženke. Kada ispitivanje započne nijedna eksperimentalna životinja, bilo iz tretirane ili iz kontrolne grupe, ne sme da bude u fazi sisanja.

*1.6.1.2. Broj i pol*

Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa ima dovoljan broj životinja kako bi se dobilo oko 20 gravidnih ženki neposredno pre ili blizu okota.

Cilj je da se proizvede dovoljno trudnoća i potomstva kako bi se obezbedila svrsishodna procena potencijala supstance da utiče na plodnost, graviditet i majčinsko ponašanje u P generaciji životinja, i odojčad, rast i razvoj F1 potomaka od začeća do odbijanja od sise.

*1.6.1.3. Uslovi ispitivanja*

Obezbeđuje se slobodan pristup hrani i vodi. Uoči koćenja, gravidne ženke se smeštaju u posebne kaveze za koćenje ili uzgoj i daje im se materijal za gnežđenje.

*1.6.1.4. Dozni nivoi*

Koriste se najmanje tri tretirane grupe i kontrolna grupa. Ako se za primenu ispitivane supstance upotrebljava rastvarač, kontrolna grupa prima najveću korišćenu zapreminu rastvarača. Ukoliko ispitivana supstanca uzrokuje smanjeno uzimanje ili iskorišćenost hrane, neophodno je koristiti dodatnu kontrolnu grupu koja bi se hranila. U idealnom slučaju, osim ako postoji ograničenje fizičko/hemijske prirode ili biološki efekti ispitivane supstance, najviši dozni nivo izaziva toksičnost, ali ne smrtnost kod životinja roditelja (P). Srednja doza izaziva minimalne toksične efekte koji bi se mogli pripisati ispitivanoj supstanci, a niska doza ne izaziva nikakve primetne štetne efekte kod roditelja ili potomaka. Kada se daje prisilnim hranjenjem ili kao kapsula, doza koja se daje svakoj životinji određuje se prema njenoj telesnoj masi i podešavati svake nedelje prema promenama telesne mase. Doze za gravidne ženke mogu se određivati prema telesnoj masi nultog ili šestog dana graviditeta, ako je poželjno.

*1.6.1.5. Ispitivanje granične doze*

U slučaju supstance sa niskom toksičnošću, ako dozni nivo od najmanje 1.000 mg/kg ne proizvodi nikakav dokaz interferencije sa reprodukcijom, ispitivanja pri drugim doznim nivoima nisu neophodna. Ako preliminarno ispitivanje pri visokom doznom nivou sa jasnim dokazom toksičnosti po majku ne pokaže štetne efekte na plodnost, nisu neophodna ispitivanja drugih doznih nivoa.

**1.6.2. Izvođenje ispitivanja**

*1.6.2.1. Eksperimentalni rasporedi*

Dnevno doziranje roditeljskih (P) mužjaka se počinje kad su stari oko pet do devet nedelja, a nakon što su odbijeni od sise i aklimatizovani najmanje pet dana. Kod pacova doziranje se nastavlja 10 nedelja pre perioda parenja (kod miševa osam nedelja). Mužjaci se lišavaju života na human način i pregledaju ili na kraju perioda parenja ili se, alternativno, mužjaci mogu zadržati na eksperimentalnoj ishrani za moguću produkciju drugog legla i usmrtiti i pregledati negde pre kraja studije. Doziranje roditeljskih (P) ženki počinje se posle najmanje pet dana aklimatizacije i nastavlja najmanje dve nedelje pre parenja. Dnevno doziranje P ženki nastavlja se tokom perioda parenja od tri nedelje, graviditeta i do odbijanja od sisa F1 potomaka. Potrebno je razmotriti modifikaciju rasporeda doziranja na osnovu drugih podataka o ispitivanoj supstanci, kao što su podaci o indukciji metabolizma ili bioakumulaciji.

*1.6.2.2. Postupak parenja*

U ispitivanju reproduktivne toksičnosti primenjuje se parenje 1:1 (jedan mužjak s jednom ženkom) ili 1:2 (jedan mužjak s dve ženke).

Kod postupka parenja 1:1, jedna ženka se smešta s istim mužjakom do pojave graviditeta ili posle isteka perioda od tri nedelje. Svakog jutra ženka se pregleda na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nulti dan graviditeta definiše se kao dan kada je utvrđena prisutnost sperme ili vaginalnog čepa.

Parovi koji ne uspeju da se spare procenjuju se kako bi se utvrdio uzrok neplodnosti.

Taj postupak može da uključi procedure kao što su dodatna mogućnost parenja sa drugim plodnim mužjacima ili ženkama, mikroskopski pregled reproduktivnih organa i ispitivanja ciklusa "estrusa" ili spermatogeneze.

*1.6.2.3. Veličine legla*

Životinjama koje su primale supstancu tokom ispitivanja plodnosti dozvoljava se normalno koćenje i podizanje mladih do stadijuma odbijanja od sise, bez standardizacije legla.

Tamo gde se primenjuje standardizacija preporučuje se sledeća procedura: između prvog i četvrtog dana posle rođenja veličina legla se može podesiti odstranjivanjem prekobrojnih mladunaca selekcijom kako bi se postiglo, što je približnije moguće, veličina od četiri mužjaka i četiri ženke po leglu. Ako broj mužjaka ili ženki ne dopušta selekciju od četiri mladunca svakog pola po leglu, prihvatljivo je i delimično sastavljanje (npr. pet mužjaka i tri ženke). Prilagođavanje se ne obavlja u leglima s manje od osam mladih.

*1.6.2.4. Posmatranja*

Tokom perioda ispitivanja potrebno je bar jednom dnevno posmatrati svaku životinju. Beleže se promene ponašanja, znaci teškog ili produženog koćenja i svi znaci toksičnosti, uključujući i mortalitet. Za vreme perioda pred parenje i perioda parenja potrebno je dnevno obavljati merenje potrošnje hrane. Posle koćenja i za vreme dojenja merenje potrošnje hrane (i vode, ako se ispitivana supstanca daje u vodi za piće) se obavlja istog dana kad i merenje mase legla. Telesna masa P mužjaka i ženki meri se prvog dana doziranja, a posle toga jednom nedeljno. Ova zapažanja se navode za svaku odraslu životinju pojedinačno.

Trajanje gestacije računa se od nultog dana graviditeta. Svako leglo se pregleda što je moguće pre po porođaju, kako bi se utvrdio broj i pol mladih, mrtvorođenih, živih mladih i prisutnost većih anomalija.

Mrtvorođeni i mladunci koji su lišeni života na human način četvrtog dana čuvaju se i ispituju kako bi se utvrdili mogući defekti. Živi mladunci se prebrojavaju i meri se masa legla jutro posle rođenja i četvrtog i sedmog dana, a posle toga jednom nedeljno, sve do završetka studije, kada se životinje mere pojedinačno. Beleže se fizičke ili abnormalnosti u ponašanju kod ženki ili mladunaca.

*1.6.2.5. Patologija*

1.6.2.5.1. Postmortalni pregled

U vreme lišavanja života na human način ili smrti tokom ispitivanja životinje P generacije se makroskopski pregledaju kako bi se utvrdile strukturne abnormalnosti ili patološke promene, s posebno posvećenom pažnjom na pregled organa reproduktivnog sistema. Mrtvi ili umirući mladunci se pregledaju kako bi se uočili defekti.

1.6.2.5.2. Histopatologija

Jajnici, uterus, cerviks, vagina, testisi, epididimisi, semene kesice, prostata, koagulišuća žlezda, hipofiza i ciljni organ(i) svih P životinja se čuvaju za mikroskopski pregled. U slučaju da se ti organi ne pregledaju u ispitivanjima drugih doznih nivoa, potrebno ih je mikroskopski pregledati kod svih životinja izloženih visokim dozama i kod kontrolnih životinja i onih koje su uginule tokom studije kada je izvodljivo.

Organi koji pokazuju abnormalnosti kod tih životinja pregledaju se i kod svih drugih P životinja. Tom prilikom potrebno je izvršiti mikroskopski pregled svih tkiva koja pokazuju veće patološke promene. Kao što je preporučeno kod postupka parenja, reproduktivni organi životinja kod kojih postoji sumnja na neplodnost podvrgavaju se mikroskopskom pregledu.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno, tako da se za svaku ispitivanu grupu navodi: broj životinja na početku ispitivanja, broj plodnih mužjaka, broj gravidnih ženki, tipovi promena i procenat životinja koje pokazuju svaki tip promene.

Kada je moguće, numerički rezultati se ocenjuju pomoću odgovarajuće statističke metode. Može se primeniti bilo koja prihvaćena statistička metoda.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

- vrsti/soju;

- toksičnom odgovoru po polu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i viabilitet;

- vremenu smrti tokom studije ili da li su životinje preživele do trenutka predviđenog lišavanja života na human način ili završetka ispitivanja;

- tabeli sa podacima o telesnoj masi svakog legla, srednja vrednost: masa mladunaca i pojedinačna telesna masa mladunaca na kraju ispitivanja;

- toksičnim ili drugim efektima na reprodukciju, potomke ili postnatalni rast;

- danu utvrđivanja svakog abnormalnog znaka i njegovog daljeg toka;

- telesnoj masi P životinja;

- nalazima obdukcije;

- detaljan opis svih mikroskopskih nalaza;

- statističkoj obradi rezultata, gde je moguće;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.35. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU NA DVE GENERACIJE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 416 (2001).

*1.1. UVOD*

Ova metoda ispitivanja reprodukcije na dve generacije namenjena je da obezbedi opšte podatke u vezi efekata ispitivane supstance na integritet i učinak muških i ženskih reproduktivnih sistema, uključujući funkciju polnih žlezda, estrus ciklus, parenje, začeće, gestaciju, porođaj, laktaciju i odbijanje od sise i rast i razvoj potomstva. Studija može da pruži i podatke o efektima ispitivane supstance na neonatalni morbiditet, mortalitet i preliminarne podatke o prenatalnoj i postnatalnoj toksičnosti po rast i razvoj i da usmeri buduća ispitivanja. Pored proučavanja rasta i razvoja F1 generacije, ova eksperimentalna metoda se predviđa i za procenu integriteta i sposobnosti muških i ženskih reproduktivnih sistema, kao i rasta i razvoja F2 generacije. Za dodatne podatke o toksičnosti po rast i razvoj i funkcionim nedostacima, u ovaj protokol mogu se uključiti dodatni segmenti ispitivanja, konsultujući metode za toksičnost po rast i razvoj i/ili neurotoksični efekti za rast i razvoj neurotoksičnost u periodu rasta i razvoja, ako odgovara, ili se ovi efekti mogu proučavati u posebnim studijama, koristeći odgovarajuće eksperimentalne metode.

*1.2. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca se daje u rastućim dozama muškim i ženskim jedinkama u grupama. Mužjacima P generacije daju se doze za vreme rasta i tokom bar jednog celog ciklusa spermatogeneze (približno 56 dana kod miševa i 70 dana kod pacova) kako bi se izazvali svi štetni efekti na spermatogenezu. Efekti na spermu se određuju brojnim parametrima sperme (npr. morfologija i pokretljivost spermatozoida) i pripremom tkiva i detaljnom histopatologijom. Ukoliko postoje podaci o spermatogenezi iz prethodne studije koja je trajala dovoljno dugo i u kojoj je primenjeno ponovljeno doziranje, npr. 90-dnevna studija, mužjake P generacije nije potrebno uključiti u procenu. Preporučuje se da uzorci ili digitalni snimci sperme P generacije budu sačuvani kako bi se omogućila kasnija procena. Ženke P generacije se doziraju tokom rasta i tokom nekoliko estrus ciklusa kako bi se uočili bilo kakvi štetni efekti ispitivane supstance na normalnost estrus ciklusa. Ispitivana supstanca se daje roditeljskim (P) životinjama za vreme parenja, za vreme graviditeta koji su usledili i tokom odbijanja od sise njihovog F1 potomstva. Po odbijanju od sise nastavlja se sa davanjem supstance F1 potomstvu tokom njihovog rasta do odraslog doba, parenja i produkcije F2 generacije, sve dok F2 generacija ne bude odbijena od sise.

Obavljaju se klinička opažanja i patološki pregledi na svim životinjama kako bi se utvrdili znakovi toksičnosti sa posebnim naglaskom na efekte na integritet i sposobnost muških i ženskih reproduktivnih sistema i rast i razvoj potomstva.

*1.3. OPIS METODE*

**1.3.1. Izbor životinjskih vrsta**

Preporučena vrsta za ispitivanje je pacov. Ukoliko se koriste druge vrste, daje se opravdanje, a neophodne su i odgovarajuće izmene metode. Ne koriste se sojevi sa slabom plodnošću ili oni sa poznatom visokom učestalošću pojave nedostataka u rastu i razvoju. Na početku studije, varijacija u telesnoj masi životinja koje se koriste mora biti minimalna i ne sme da prelazi 20% srednje telesne mase za svaki pol.

**1.3.2. Uslovi smeštaja i ishrane**

Temperatura u eksperimentalnoj prostoriji za životinje je 22° C (± 3 °C). Relativna vlažnost je najmanje 30%, i po mogućnosti ne prelazi 70%, osim za vreme čišćenja prostorije. Idealna vlažnost je 50% do 60%. Osvetljenje je veštačko, uz izmenu 12 sati svetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se koristi uobičajena laboratorijska ishrana uz neograničenu količinu vode za piće. Izbor ishrane je pod uticajem potrebe da se obezbedi odgovarajuća mešavina ispitivane supstance koja se primenjuje ovom metodom.

Životinje mogu biti smeštene pojedinačno ili u kavezima u malim grupama istog pola. Parenje se obavlja u odgovarajućim kavezima. Posle dokazane kopulacije, sparene ženke se smeštaju pojedinačno u kaveze za porođaj ili materinstvo. Spareni pacovi mogu se držati u malim grupama i odvojeni jedan ili dva dana pre koćenja. Sparenim životinjama se obezbeđuje određeni odgovarajući materijal za gnežđenje neposredno pre porođaja.

**1.3.3. Priprema životinja**

Koriste se zdrave mlade životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijske uslove tokom najmanje pet dana i koje nisu bile podvrgnute prethodnim eksperimentalnim postupcima. Eksperimentalne životinje treba okarakterisati prema vrsti, soju, izvoru, polu, telesnoj masi i/ili starosti. Kako bi se izbeglo parenje srodnih životinja mora biti poznato bilo koje srodstvo među životinjama. Životinje se slučajnim izborom razvrstavaju u kontrolne ili tretirane grupe (preporučuje se stratifikacija po telesnoj masi). Kavezi se raspoređuju tako da se smanje mogući efekti rasporeda kaveza. Svakoj životinji se pripisuje jedinstveni identifikacioni broj. Za P generaciju ovo se radi pre početka doziranja. Za F1 generaciju ovo se radi prilikom odbijanja od sise za životinje koje su odabrane za parenje. Podaci o leglu iz kog potiče životinja čuvaju se za sve izabrane F1 životinje. Pojedinačna identifikacija mladunaca odmah posle rođenja preporučuje se prilikom individualnog merenja mladunaca ili prilikom razmatranja bilo kakvog funkcionalnog ispitivanja.

Roditeljske (P) životinje treba da budu stare oko pet do devet nedelja na početku doziranja. Životinje svih eksperimentalnih grupa su, koliko je izvodljivo, ujednačene telesne mase i starosti.

*1.4. POSTUPAK*

**1.4.1. Broj i pol životinja**

Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa ima dovoljan broj životinja kako bi se dobilo ne manje od 20 gravidnih ženki na porođaju ili pred porođaj. Za supstance koje uzrokuju neželjene efekte tokom tretmana (npr. sterilnost, izražena toksičnost pri visokim dozama) ovo nije moguće. Cilj je da se dobije dovoljno trudnoća kako bi se obezbedila značajna ocena potencijala supstance da utiče na plodnost, trudnoću i materinsko ponašanje, sisanje, rast i razvoj F1 potomstva od začeća do zrelosti, kao i na rast i razvoj njihovog potomstva (F2) do odbijanja od sise. Ako se ne postigne željeni broj gravidnih životinja (odnosno 20) studija se ne smatra obavezno neodgovarajućom i procenjuje se od slučaja do slučaja.

**1.4.2. Priprema doza**

Preporučuje se da se ispitivana supstanca daje peroralno (putem hrane, vode za piće ili sondom), osim ukoliko se neki drugi put primene (npr. dermalno ili inhalaciono) ne smatra prikladnijim.

Kada je potrebno, ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje se da se, kada god je moguće, koristi vodeni rastvor/suspenzija, a zatim da se razmotri rastvor/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) i zatim rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za vehikulume koji nisu voda moraju biti poznate toksične karakteristike. Potrebno je odrediti stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu.

**1.4.3. Doziranje**

Koristi se najmanje tri dozna nivoa i istovremena kontrola. Osim ukoliko nije ograničena fizičkom i hemijskom prirodom ili biološkim efektima ispitivane supstance, bira se najveći dozni nivo sa ciljem da se izazove toksičnost ali ne smrt ili teška patnja. U slučaju neočekivane smrtnosti, studija sa stopom smrtnosti od manje od 10% kod roditeljskih (P) životinja još uvek je prihvatljiva. Opadajući niz doznih nivoa bira se tako da se pokaže bilo kakav efekat povezan sa doziranjem i nivoom doza pri kojima se ne primećuju štetni efekti (NOAEL). Često su optimalni dvostruki do četvorostrukih intervala za postavljanje opadajućih doznih nivoa, a dodatak četvrte eksperimentalne grupe je često prihvatljiviji od korišćenja vrlo velikih intervala (npr. više od faktora 10) između doziranja. Za studije ishrane intervali doza ne smeju biti veći od trostrukih. Nivoi doza se biraju uzimajući u obzir bilo koje postojeće podatke o toksičnosti, posebno rezultate iz studija s ponovljenim doziranjem. Uzimaju se u obzir bilo koji raspoloživi podaci o metabolizmu i kinetici ispitivanog jedinjenja ili sličnih materijala. Ovi podaci pomažu u pokazivanju adekvatnosti režima doziranja.

Kontrolna grupa je netretirana grupa ili grupa sa vehikulumom ukoliko se on koristi za primenu ispitivane supstance. Osim tretmana sa ispitivanom supstancom, životinje u kontrolnim grupama se tretiraju na identičan način kao i jedinke iz tretiranih grupa ispitivanja. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvećoj zapremini koja se koristi. Ukoliko se ispitivana supstanca daje putem hrane i uzrokuje smanjeno uzimanje ili iskoristljivost hrane, korišćenje kontrolne grupe za unos hrane može se smatrati neophodnim. Alternativno, podaci iz kontrolisanih studija namenjenih za ocenjivanje efekata smanjene potrošnje hrane na reproduktivne parametre koriste se umesto istovremene kontrolne grupe za unos hrane.

Uzimaju se u obzir sledeće karakteristike vehikuluma i drugih aditiva: efekti na apsorpciju, raspodelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; efekte na hemijska svojstva ispitivane supstance koja mogu izmeniti njena toksična svojstva i efekte na potrošnju hrane ili vode, ili na nutritivni status životinja.

**1.4.4. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko se u oralnoj studiji pri jednom doznom nivou od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan ili, za primenu putem hrane ili vode odgovarajući procenat koji se koristi u postupku opisanom u ovoj studiji, ne uzrokuje uočljive toksične efekte kod roditeljskih životinja ili njihovog potomstva, i ako se toksičnost ne može očekivati na osnovu podataka iz strukturno i/ili metabolički sličnih jedinjenja, nije neophodna cela studija uz korišćenje nekoliko doznih nivoa. Primenjuje se ispitivanje granične doze, osim u slučaju kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za korišćenjem viših nivoa oralne doze. Za druge načine primene kao što su inhalacija i dermalna primena, fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance, kao što su rastvorljivost, često mogu ukazati na granicu najvećeg ostvarljivog nivoa izlaganja.

**1.4.5. Primena doza**

Životinje se doziraju ispitivanom supstancom sedam dana u nedelji. Preporučuje se oralna primena (hrana, piće ili sonda). Ukoliko se koristi neki drugi put primene, to se opravdava i vrše se potrebne izmene. Sve životinje se doziraju na isti način tokom odgovarajućeg perioda ispitivanja. Kad se ispitivana supstanca primenjuje sondom, primena se obavlja putem trbušne cevi. Zapremina primenjene tečnosti ne sme preći 1 ml/kg TM (0,4 ml/100 g TM najviše za kukuruzno ulje), osim u slučaju vodenih rastvora gde se može koristiti 2 ml/100 g TM. Osim kod iritabilnih i korozivnih supstanci koje pokazuju lošije efekte u većim koncentracijama, varijabilnost zapremine koja se primenjuje minimalizuje se prilagođavanjem koncentracije kako bi se obezbedila konstantna zapremina pri svim doznim nivoima. Kod prisilnog hranjenja mladunci primaju eksperimentalnu supstancu kroz mleko, sve dok se ne mogu direktno dozirati posle odbijanja od sise. Kada se supstanca primenjuje putem hrane ili vode za piće, mladunci dodatno primaju ispitivanu supstancu čim počnu samostalno da se hrane za vreme poslednje nedelje perioda laktacije.

Kod supstance koja se daje putem hrane ili vode za piće, važno je obezbediti da količina primenjene ispitivane supstance ne utiče na balans normalne ishrane ili vode. Kad se ispitivana supstanca daje putem hrane, može se koristiti stalna prehrambena koncentracija (ppm) ili stalni dozni nivo prema telesnoj masi životinje. Alternativne metode se obrazlažu. Ukoliko se supstanca daje prisilno, doza se primenjuje u slično vreme svakog dana i prilagođena najmanje nedeljno kako bi se održao konstantni dozni nivo u odnosu na telesnu masu životinje. Podaci o placentalnoj raspodeli uzimaju se u obzir prilikom prilagođavanja prisilne doze zasnovane na telesnoj masi.

**1.4.6. Eksperimentalni rasporedi**

Dnevno doziranje roditeljskih (P) mužjaka i ženki započinje se kad su stari pet do devet nedelja. Dnevno doziranje F1 mužjaka i ženki započinje po odbijanju od sise. U slučaju primene ispitivane supstance putem hrane ili vode za piće, direktno izlaganje F1 mladunaca ispitivanoj supstanci može započeti već za vreme perioda laktacije. Za oba pola (P i F1), doziranje se nastavlja najmanje 10 nedelja pre perioda parenja. Doziranje se nastavlja za oba pola za vreme dvonedeljnog perioda parenja. Muške jedinke se lišavaju života na human način i pregledaju kada više ne budu potrebne za ocenjivanje reproduktivnih efekata. Za roditeljske (P) ženke, doziranje se nastavlja tokom trudnoće i sve do odbijanja od sise F1 potomaka. Uzimaju se u obzir modifikacije u rasporedu doziranja na osnovu raspoloživih podataka o ispitivanoj supstanci, uključujući postojeće podatke o toksičnosti, indukciji metabolizma ili bioakumulaciji. Doza za svaku životinju je zasnovana na najskorijim merenjima telesne mase. Obratiti pažnju prilikom prilagođavanja doze tokom poslednjeg tromesečja trudnoće.

Tretiranje P i F1 mužjaka i ženki nastavlja se do lišavanja života na human način. Sve P i F1 odrasli mužjaci i ženke se lišavaju života na human način kada više nisu potrebni za procenu reproduktivnih efekata. F1 potomstvo koje nije odabrano za parenje i čitavo F2 potomstvo lišava se života na human način posle odbijanja od sise.

**1.4.7. Postupak parenja**

*1.4.7.1. Roditeljsko (P) parenje*

Za svako parenje svaka ženka se smešta sa jednim mužjakom iz istog doznog nivoa (1:1 parenje) sve dok ne dođe do kopulacije ili dok ne proteknu dve nedelje. Ženke se svaki dan pregledaju na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nulti dan trudnoće definiše se kao dan kad se pronađe sperma ili vaginalni čep. U slučaju da parenje nije uspešno, razmatra se ponovno parenje ženki sa dokazanim mužjacima iz iste grupe. Parovi se jasno označavaju u podacima. Parenje srodnih jedinki se izbegava.

*1.4.7.2. F1 parenje*

Za parenje F1 potomstva izabere se najmanje jedan mužjak i jedna ženka pri odbijanju od sise iz svakog legla za parenje sa drugim mladuncima iz istog doznog nivoa ali iz drugog legla, kako bi se proizvela F2 generacija. Izbor mladunaca iz svakog legla je slučajan ukoliko se ne uoče značajne razlike u telesnoj masi ili izgledu između jedinki u leglu. U slučaju da se takve razlike uoče, biraju se najbolji predstavnici svakog legla. Ovo se najbolje obavlja na osnovu telesne mase ali može biti pogodnije da se obavi na osnovu izgleda. F1 potomstvo se ne pari sve dok ne dostigne punu seksualnu zrelost.

Parovi bez potomaka pregledaju se kako bi se utvrdio uzrok neplodnosti. To može uključivati postupke kao što su: dodatne prilike za parenje sa drugim dokazanim jedinkama, mikroskopski pregled reproduktivnih organa i ispitivanje estrus ciklusa ili spermatogeneze.

*1.4.7.3. Drugo parenje*

U nekim slučajevima, kao što su promene u veličini legla povezane sa tretmanom ili uočavanje sumnjivog efekta za vreme prvog parenja, preporučuje se da se P ili F1 odrasle jedinke ponovo pare kako bi se proizvelo drugo leglo. Preporučuje se da se ponovno pare mužjaci ili ženke koje nisu proizvele potomstvo s dokazanim priplodnim životinjama suprotnog pola. Ukoliko se smatra da je drugo leglo neophodno u bilo kojoj generaciji, životinje se ponovno pare približno jednu nedelju posle odbijanja od sise prethodnog legla.

*1.4.7.4. Veličina legla*

Životinjama se omogućava da imaju normalna legla i da odgajaju svoje potomstvo do odbijanja od sise. Standardizacija veličine legla nije obavezna. Ako se izvodi standardizacija, korišćena metoda se detaljno opisuje.

*1.5. POSMATRANJA*

**1.5.1. Klinička posmatranja**

Svakog dana se obavlja opšta klinička posmatranja, a u slučaju prisilnog hranjenja njegov vremenski raspored uzima u obzir predviđeno vreme za pojavu maksimalnih efekata posle doziranja. Beleže se promene u ponašanju, znaci teškog ili dugotrajnog koćenja i svi znaci toksičnosti. Detaljniji pregled svake životinje obavlja se najmanje jednom nedeljno i najbolje ga je obavljati prilikom merenja telesne mase životinja. Dva puta dnevno, a tokom vikenda jednom dnevno, kad odgovara, sve životinje se pregledaju na morbiditet i smrtnost.

**1.5.2. Telesna masa i konzumiranje, hrane/vode roditeljskih životinja**

Telesna masa roditeljskih životinja (P i F1) meri se prvog dana doziranja i najmanje jednom nedeljno posle toga. Telesna masa roditeljskih ženki (P i F1) meri se najmanje nultog, sedmog, četrnaestog, dvadesetog ili dvadeset prvog dana gestacije, kao i za vreme laktacije u iste dane kada se meri masa legla i na dan kad se životinje lišavaju života na human način. Ova opažanja se navode pojedinačno za svaku odraslu životinju. Pre parenja i u periodu gestacije potrošnja hrane se meri najmanje jednom nedeljno. Unos vode meri se najmanje jednom nedeljno ukoliko se ispitivana supstanca primenjuje putem vode.

**1.5.3. Estrus ciklus**

Dužina i normalnost estrus ciklusa ocenjuju se za P i F1 ženke vaginalnim brisevima pre parenja i po izboru za vreme parenja, dok se ne pronađu dokazi parenja. Kod dobijanja vaginalnih/cervikalnih ćelija, pazi se kako bi se izbeglo nadraživanje (prekidanje, perturbacija, poremećaj) sluznice i potom izazivanje lažne trudnoće**1**.

**1.5.4. Parametri sperme**

Za sve P i F1 mužjake prilikom lišavanja života na human način beleži se masa testisa i epididimisa i po jedan od organa se čuva za histopatološki pregled (videti odeljke 1.5.7. i 1.5.8.1. ove metode). Od podskupa od najmanje deset mužjaka iz svake grupe P i F1 mužjaka preostali testisi i epididimisi se koriste za prebrojavanje spermatida otpornih na homogenizaciju i rezerve spermatozoida kaudalnog dela epididimisa. Iz iste podgrupe mužjaka spermatozoidi iz kaude epididimidisa ili vas deferens-a se prikupljaju zbog ocenjivanja njihove mobilnosti i morfologije. Ukoliko se uoče efekti u vezi sa tretmanom ili kada postoje dokazi o tome iz drugih studija o mogućim efektima na spermatogenezu, ocenjivanje spermatozoida se obavlja kod svih mužjaka u svakoj doznoj grupi. U protivnom se brojanje može ograničiti na P i F1 mužjake iz kontrolne i visokodozne grupe.

Broji se ukupni broj spermatida testisa otpornih na homogenizaciju i spermatozoida kaudalnog dela epididimisa**2, 3**. Kaudalne rezerve spermatozoida mogu se izvesti iz koncentracije i zapremine sperme u suspenziji korišćenoj za kompletiranje kvalitativnih ocenjivanja i broja spermatozoida dobijenog kasnijim mlevenjem i/ili homogenizaciom preostalog kaudalnog tkiva. Brojanje se obavlja na odabranoj podgrupi mužjaka iz svih doznih grupa odmah nakon lišavanja života na human način, osim ako se ne naprave video ili digitalni snimci ili ako se primerci ne zamrznu i analiziraju kasnije. U tim slučajevima kontrolne i grupe velikih doza prve se analiziraju. Ukoliko se ne uoče efekti u vezi sa tretmanom (npr. efekti na broj spermatozoida, pokretljivost ili morfologiju), preostale grupe se ne analiziraju. Kada se takvi efekti uoče u grupi visoke doze, onda se ocenjuju i grupe nižih doza.

Pokretljivost epididimalnih (ili ductus deferens) spermatozoida se ocenjuje ili snima odmah nakon lišavanja života na human način. Sperma se pribavlja uz minimalnu štetu i razblažuje za analizu pokretljivosti korišćenjem prihvatljivih metoda**4**. Procenat progresivno pokretljivih spermatozoida određuje se subjektivno ili objektivno. Kada se obavlja kompjuterska analiza pokretljivosti**5, 6, 7, 8, 9, 10** izvođenje progresivne pokretljivosti se oslanja na korisnički definisane granične vrednosti za prosečnu brzinu i pravac putanje ili na linearni indeks. Ukoliko su uzorci snimljeni**11** ili ukoliko postoje slike zabeležene na drugačiji način u trenutku obdukcije, može se obaviti kasnija analiza P i F1 mužjaka samo iz kontrolne i grupe s visokom dozom, osim ukoliko se ne uoče efekti vezani za tretman. U tom slučaju se analiziraju i grupe nižih doza. Ukoliko nema video ili digitalnog zapisa svi uzorci u svim tretiranim grupama se analiziraju pri postmortalnom pregledu.

Radi se morfološka analiza uzorka spermatozoida iz epididimidisa (ili vas deferens-a). Spermatozoidi (najmanje 200 po uzorku) se analiziraju kao fiksirani, mokri preparat**12** i klasifikuju kao normalni ili abnormalni. Primeri morfološke abnormalnosti spermatozoida uključuju fuziju, izolovane glave i deformisane glave i/ili repove. Ocenjivanje se obavlja na odabranoj podgrupi mužjaka svih doznih grupa, bilo odmah nakon lišavanja života na human način ili kasnije na osnovu video ili digitalnih snimaka. Jednom fiksirani razmazi mogu se čitati i kasnije. U tim slučajevima mogu se prvo analizirati kontrolne i grupe visokih doza.

Ukoliko se ne uoče efekti u vezi sa tretmanom (npr. efekti na morfologiju spermatozoida), preostale grupe nije potrebno analizirati. Kada se takvi efekti uoče kod grupe visoke doze, onda se i grupe nižih doza ocenjuju.

Ukoliko je bilo koji od gore navedenih parametara za ocenjivanje sperme već ispitan kao deo studije sistemske toksičnosti koja traje najmanje 90 dana, takve analize nije neophodno ponavljati u studiji na dve generacije. Preporučuje se da se sačuvaju uzorci ili digitalni snimci sperme P generacije, kako bi se po potrebi omogućila kasnija analiza.

**1.5.5. Potomstvo**

Svako leglo se pregleda što je moguće pre nakon koćenja (dan laktacije 0) kako bi se ustanovio broj i pol mladunaca, mrtvorođeni, živorođeni i prisutnost većih anomalija. Mladunci koji su pronađeni mrtvi na dan 0, ukoliko nisu macerirani, pregledaju se kako bi se otkrili mogući defekti i uzrok smrti i čuvaju se. Živi mladunci se prebrojavaju i meri se telesna masa svakog pojedinačno, po rođenju (dan laktacije 0) ili na dan 1 i danima koji su redovno predviđeni za merenje telesne mase, npr. dani 4, 7, 14. i 21. dan laktacije. Beleže se fizičke ili anomalije u ponašanju uočene na majkama ili potomstvu.

Fizički razvoj potomstva beleži se pre svega prema dobijanju na telesnoj masi. Drugi fizički parametri (npr. otvaranje uha i oka, izbijanje zuba, rast dlake) mogu dati dodatne podatke, ali je ove podatke najbolje ocenjivati u kontekstu podataka o polnom sazrevanju (npr. starost i telesna masa prilikom otvaranja vagine ili balano-prepucijalne separacije)**13**. Funkcionalna ispitivanja (npr. motorike, senzorne funkcije, ontogenog refleksa) F1 potomstva pre i/ili posle odbijanja od sise, posebno ona vezana uz polno sazrevanje preporučuju se ukoliko nisu uključena u posebne studije. Starost prilikom sazrevanja vagine i prepucijalne separacije utvrđuje se za F1 mladunce koji se odbijaju od sise, a koji su odabrani za parenje. Anogenitalno rastojanje se meri nultog postnatalnog dana kod F2 mladunaca ukoliko je izazvano alteracijama u odnosu polova u F1 ili vremenu polnog sazrevanja.

Funkcionalna posmatranja mogu da se izostave kod grupa koje na drugi način pokazuju jasne znake štetnih efekata (npr. značajno smanjenje u dobijanju na telesnoj masi, itd). Ukoliko se rade funkcionalna istraživanja, ne izvode se na mladuncima koji su odabrani za parenje.

**1.5.6. Postmortalni pregled**

Prilikom zaključivanja ili smrti u toku studije, sve roditeljske životinje (P i F1), svi mladunci sa spoljnjim abnormalnostima ili kliničkim znacima, kao i jedno slučajno odabrano mladunče po polu po leglu iz F1 i F2 generacije makroskopski se pregleda kako bi se uočile bilo kakve strukturne abnormalnosti ili patološke promene. Posvećuje se posebna pažnja organima reproduktivnog sistema. Mladunci nađeni na samrti pa humano lišeni života i mrtva mladunčad, kada nisu macerirana, ispituju se na moguće defekte i/ili uzrok smrti i čuvaju.

Materice svih ženki koje su jednom rađale pregledaju se na prisustvo i broj implantacionih mesta na način koji ne kompromituje histopatološko ocenjivanje.

**1.5.7. Merenje mase organa**

Prilikom zaključivanja utvrđuje se telesna masa i masa sledećih organa za sve P i F1 roditeljske životinje (parni organi se mere individualno):

- materica, jajnici;

- testisi, epididimidis (ukupno i kauda);

- prostata;

- semene kesice sa koagulacionim žlezdama i njihove tečnosti i prostata (kao jedna jedinica);

- mozak, jetra, bubrezi, slezina, hipofiza, tiroidna i adrenalne žlezde i poznati ciljni organi.

Utvrđuje se terminalna telesna masa za F1 i F2 mladunce koji su odabrani za obdukciju. Mere se sledeći organi od jednog slučajno odabranog mladunca po polu po leglu (videti odeljak 1.5.6. ove metode): mozak, slezina i timus.

Rezultati obdukcije i merenja mase organa procenjuju se u kontekstu sa zapažanjima iz drugih studija sa ponovljenim dozama, kada je izvodljivo.

**1.5.8. Histopatološka ispitivanja**

*1.5.8.1. Roditeljske životinje*

Sledeći organi i tkiva roditeljskih (P i F1) životinja ili reprezentativni uzorci istih se fiksiraju i čuvaju u odgovarajućem medijumu za histopatološku analizu:

- vagina, materica sa cerviksom i jajnici (sačuvani u odgovarajućem fiksativu);

- jedan testis (sačuvan u Bouin-ovom ili sličnom fiksativu), jedan epididimis, semene kesice, prostata i koagulaciona žlezda;

- prethodno identifikovani ciljni organi od svih P i F1 životinja odabranih za parenje.

Potpuna histopatološka ispitivanja gore navedenih sačuvanih organa obavljaju se za sve jedinke iz grupe kojoj je davana visoka doza i kontrolne grupe P i F1 životinja izabranih za parenje. Ispitivanje jajnika P životinja je opcionalno. Organi koji pokazuju promene vezane za tretman ispituju se u grupama niske i srednje doze kako bi se pomoglo određivanje NOAEL. Reproduktivni organi životinja u grupama s niskim i srednje visokim dozama za koje se sumnja na smanjenu plodnost, npr. onih koje se nisu parile, koje nisu začele, iznele ili rodile zdravo potomstvo ili na čiji je estrus ciklus, broj spermatozoida, mobilnost ili morfologiju bilo uticaja, podvrgavaju se histopatološkom ocenjivanju. Ispituju se sva veća oštećenja kao što su atrofija ili tumori.

Obavlja se detaljan histopatološki pregled testisa (npr. korišćenjem Bouinovog fiksativa, učvršćivanjem parafinom i poprečnim presecima debljine 4 µm do 5 µm) kako bi se identifikovali efekti vezani za tretman kao što su zadržane spermatide, slojevi ili tipovi germinativnih ćelija koji nedostaju, divovske ćelije sa više jedara ili otpadanje spermatogenih ćelija u lumen**14**. Pregled intaktnog epididimisa uključuje pregled glave, tela i repa što se može postići analizom uzdužnih preseka. Epididimis se pregleda na infiltraciju leukocita, promene u preovlađujućim tipovima ćelija, nenormalne tipove ćelija i fagocitozu spermatozoida. Bojenje PAS-om i hematoksilinom se koristi za pregled muških reproduktivnih organa.

Postlaktacioni jajnik sadrži primordijalne i rastuće folikule kao i velika žuta tela laktacije. Histopatološki pregled otkriva kvalitativno smanjenje populacije primordijalnih folikula. Obavlja se kvantitativna analiza primordijalnih folikula za F1 ženke; broj životinja, izbor preseka jajnika i veličina uzorka preseka su statistički odgovarajući za postupak ocenjivanja koji se koristi. Pregled uključuje prebrojavanje primordijalnih folikula koji mogu biti kombinovani sa malim rastućim folikulama zbog poređenja tretiranih i kontrolnih jajnika**15, 16, 17, 18, 19**.

*1.5.8.2. Mladunci odbijeni od sisanja*

Izuzetno, nenormalno tkivo i ciljani organi svih mladunaca sa spoljnim abnormalnostima ili kliničkim znacima, kao i oni organi od slučajno odabranog mladunaca po polu po leglu iz obe F1 i F2 generacije, koji nisu odabrani za parenje biće fiksirani i čuvani u odgovarajućem medijumu za histopatološki pregled. Puna histopatološka karakterizacija sačuvanog tkiva obavlja se uz poseban naglasak na organe reproduktivnog sistema.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Podaci se navode pojedinačno i tabelarno. Navode se podaci za svaku eksperimentalnu grupu i svaku generaciju i to: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su pronađene mrtve za vreme ispitivanja ili lišene života na human način, vreme bilo koje smrti ili lišavanja života na human način, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znake toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući, vreme nastanka, trajanje i ozbiljnost toksičnih efekata, tipove zapažanja kod roditelja i potomstva, tipove histopatoloških promena i sve relevantne podatke o leglu.

Numerički rezultati se ocenjuju odgovarajućom opšteprihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode se biraju prilikom koncipiranja studije i treba ih opravdati. Statistički modeli doza-odgovor mogu biti korisni za analizu podataka. Izveštaj uključuje dovoljno podataka o metodi analize i o primenjenom kompjuterskom programu kako bi nezavisni ocenjivač/statističar mogao ponovno da proceni i rekonstruiše analizu.

*2.2. OCENJIVANJE REZULTATA*

Nalazi ove studije toksičnosti po reprodukciju na dve generacije ocenjuju se u smislu uočenih efekata uključujući obdukcione i mikroskopske nalaze. Ocenjivanje uključuje vezu ili nepostojanje veze između doze ispitivane supstance i prisustva ili odsustva pojave i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući veća oštećenja, identifikovane ciljne organe, efekt na plodnost, kliničke abnormalnosti, efekt na reprodukciju i na legla, promene telesne mase, efekte na smrtnost i sve druge toksične efekte. Prilikom ocenjivanja rezultata ispitivanja uzimaju se u obzir fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance i kada su dostupni toksikokinetičke podatke.

Pravilno izvedeno ispitivanje toksičnosti po reprodukciju obezbeđuje zadovoljavajuću procenu nivoa bez efekta i razumevanje štetnih efekata na reprodukciju, rađanje, laktaciju, postnatalni rast i razvoj, uključujući rast i polni razvoj.

*2.3. TUMAČENJE REZULTATA*

Ispitivanje toksičnosti po reprodukciju na dve generacije daje podatke o efektima ponovljenog izlaganja supstanci za vreme svih faza reproduktivnog ciklusa. Studija daje podatke o reproduktivnim parametrima i o razvoju, rastu, sazrevanju i preživljavanju potomstva. Rezultati studije tumače se zajedno sa nalazima subhroničkih studija, ispitivanja prenatalnog rasta i razvoja, toksikokinetičkih i drugih raspoloživih studija. Rezultati ove studije mogu se koristiti u proceni potrebe za daljim ispitivanjem hemikalije. Ekstrapolacija rezultata studije na čoveka je prihvatljiva do određenog stepena. Najbolje je da se koriste za obezbeđivanje podataka o nivou bez efekta i za dozvoljeno izlaganje ljudi**20, 21, 22, 23**.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda i, ako je relevantno, fizička i hemijska svojstva;

- identifikacioni podaci;

- čistoća.

2) Vehikulumu (ako odgovara):

- opravdanje za izbor vehikuluma ako nije u pitanju voda.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, ishrana, materijal za gnežđenje, itd.;

- individualna težina životinja na početku ispitivanja;

4) Uslovima ispitivanja:

- obrazloženje izbora nivoa doze;

- detalji o ispitivanoj supstanci formulacija/priprema hrane, postignute koncentracije;

- stabilnost i homogenost preparata;

- detalji o primeni ispitivane supstance;

- preračunavanje iz koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do postignute doze (mg/kg telesna masa/dan), ako je primenljivo;

- podaci o kvalitetu hrane i vode.

5) Rezultatima:

- potrošnja hrane i vode, ako je dostupno, iskorišćenje hrane (dobijanje na telesnoj masi po gramu konzumirane hrane) i potrošnja ispitivanog materijala za P i F1 životinje, osim za period kohabitacije i za poslednju trećinu perioda laktacije;

- podaci o apsorpciji (ako su dostupni);

- podaci o telesnoj masi za P i F1 životinje koje su izabrane za parenje;

- podaci o masi legla i mladunaca;

- telesna masa pri lišavanju života na human način i apsolutna i relativna masa organa za roditeljske životinje;

- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);

- vreme smrti tokom studije ili da li su životinje preživele do lišavanja života na human način;

- podaci o toksičkim reakcijama po polu i dozi, uključujući indekse parenja, plodnosti, gestacije, rođenja, održivosti i laktacije; u izveštaju se navode brojevi korišćeni za izračunavanje ovih indeksa;

- toksični i drugi efekti na reprodukciju, potomstvo, postnatalni rast, itd.;

- nalazi obdukcije;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- broj P i F1 životinja sa normalnim ciklusom i trajanje ciklusa;

- ukupni broj spermatozoida kaude epididimis, procenat progresivno pokretljivih spermatozoida, procenat morfološki normalnih spermatozoida i procenat spermatozoida sa svakom identifikovanom abnormalnošću;

- vreme do parenja, uključujući broj dana do parenja;

- trajanje gestacije;

- broj implantacija, žutih tela, veličina legla;

- broj živorođenih i post-implantacioni gubitak;

- broj mladunaca sa većim vidljivim abnormalnostima, ukoliko je određen navodi se broj kržljavaca;

- podaci o fizičkim obeležjima kod mladunaca i drugi podaci o postnatalnom rastu i razvoju; proučena fizička obeležja se opravdavaju;

- podaci o funkcionalnim zapažanjima kod mladunaca i odraslih jedinki, ako je primenljivo;

- statistička analiza rezultata, kad odgovara.

6) Obrazloženju rezultata.

7) Zaključcima, uključujući NOAEL vrednosti za efekte na majku i potomstvo.

**4. LITERATURA**

1. Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2. Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 12:92-108.

3. Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction and Fertility 54:103-107.

4. Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology 5:39 44

5. Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10(3):237- 244.

6. Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267- 273

7. Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In vitro* Demonstration. Journal of Andrology 13:409-421.

8. Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. Reproductive Toxicology 5:449-458.

9. Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

10. Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

11. Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

12. Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

13. Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

14. Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15. Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16. Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

17. Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

18. Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

19. Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20. Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull’s Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21. Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22. Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23. Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

**B.36. TOKSIKOKINETIKA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Videti Opšti uvod.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Nisu propisane.

*1.4. PRINCIP METODE*

Supstanca koja se ispituje primenjuje se odgovarajućim putem. Zavisno od svrhe studije, supstanca može da se daje kao pojedinačna ili u ponovljenoj dozi tokom određenog perioda, jednoj ili više grupa eksperimentalnih životinja. Posle toga, zavisno od tipa ispitivanja određuje se supstanca i/ili metaboliti u telesnim tečnostima, tkivima i/ili ekskretima.

Studija može da se obavi sa "neobeleženim" ili "obeleženim" oblicima supstance koja se ispituje. Kad se koristi oznaka, ona se nalazi u supstanci na takvom mestu da se obezbedi što je moguće više podataka o sudbini jedinjenja.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Nisu propisani.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

Zdrave mlade odrasle životinje aklimatizuju se na laboratorijske uslove najmanje pet dana pre obavljanja ispitivanja. Pre ispitivanja životinje se slučajnim izborom svrstavaju u grupe za tretiranje. U posebnim slučajevima mogu se koristiti i vrlo mlade, gravidne ili prethodno tretirane životinje.

**1.6.2. Eksperimentalni uslovi**

*1.6.2.1. Eksperimentalne životinje*

Toksikokinetička ispitivanja mogu da se izvode na jednoj ili više odgovarajućih životinjskih vrsta. Uzimaju se u obzir vrste koje su korišćene i koje će se koristiti u drugim studijama toksičnosti iste ispitivane supstance. Kad se u ispitivanju koriste glodari, varijacija telesne mase ne sme da prelazi ± 20% srednje telesne mase.

*1.6.2.2. Broj i pol*

Na početku, za ispitivanja apsorpcije i izlučivanja, koristi se četiri životinje u svakoj doznoj grupi. Nije obavezan izbor jednog određenog pola, ali pod određenim uslovima potrebno je ispitivanje oba pola. Ukoliko postoje razlike u odgovoru između polova, potrebno je ispitati po četiri životinje svakog pola. U slučaju ispitivanja sa vrstama koje nisu glodari, može da se koristi manji broj životinja. Kada se ispituje raspodela u tkivima, na početku, prilikom određivanja veličine grupe, uzima se u obzir broj životinja koje će se lišiti života na human način u svakoj vremenskoj instanci (tački) i broj vremenskih instanci koji se ispituje.

Kod ispitivanja metabolizma veličina grupe zavisi od potreba studije. Kod ispitivanja višestrukih doza ili višestrukih vremenskih instanci, veličina grupe zavisi od broja vremenskih tačaka i od planiranih lišavanja života na human način, ali ne sme da bude manja od dve životinje. Veličina grupe je dovoljna da obezbedi prihvatljivu karakterizaciju resorpcije, platoa i eliminacije (ako odgovara) supstance koja se ispituje i/ili metabolita.

*1.6.2.3. Dozni nivoi*

U slučaju primene pojedinačne doze koriste se najmanje dva nivoa doza: niska doza bez toksičnog efekta i visoka doza pri kojoj se mogu pojaviti promene u toksikokinetičkim parametrima ili pri kojoj se javljaju toksični efekti.

U slučaju primene ponovljenog doziranja obično je dovoljna niska doza, ali pod određenim uslovima visoka doza može da bude neophodna.

*1.6.2.4. Put primene*

U toksikokinetičkim studijama se koristi isti put i, kada odgovara, isti vehikulum kao što se koristi ili će biti korišćen u drugim studijama toksičnosti. Ispitivana supstanca se daje grupama eksperimentalnih životinja oralno prisilnim davanjem ili u hrani, nanosi se na kožu ili primenjuje inhalacijom tokom određenih vremenskih perioda. Intravenska primena ispitivane supstance može da bude korisna za utvrđenje relativne apsorpcije kada se supstanca primenjuje drugim putevima. Odmah nakon intravenskog davanja supstance dobijaju se korisni podaci o načinu raspodele.

Uzima se u obzir mogućnost interferencije vehikuluma sa ispitivanom supstancom. Potrebno je posvetiti pažnju razlikama u apsorpciji između primene ispitivane supstance prisilnim davanjem i u hrani i potrebe za tačnim (preciznim) određivanjem doze, posebno kad se supstanca daje putem hrane.

*1.6.2.5. Period posmatranja*

Sve životinje se svakodnevno posmatraju. Svakodnevno se beleže znaci toksičnosti i drugi relevantni klinički znaci, uključujući vreme njihovog nastupanja, stepen i trajanje.

**1.6.3. Postupak**

Posle merenja telesne mase, životinjama se odgovarajućim putem primenjuje supstanca koja se ispituje. Ako je relevantno, životinje se stavljaju na gladovanje pre primene supstance koja se ispituje.

*1.6.3.1. Apsorpcija*

Brzina i stepen apsorpcije primenjene supstance mogu se odrediti korišćenjem različitih metoda, sa i bez referentnih grupa**XIII**, na primer:

- određivanjem količine ispitivane supstance i/ili metabolita u ekskretima, kao što su urin, žuč, stolica, izdahnuti vazduh i u ostacima mrtvih životinja;

- poređenjem bioloških reakcija (tj. studije akutne toksičnosti) između tretiranih grupa i kontrolnih i/ili referentnih grupa;

- upoređenjem količine supstance koja je izlučena putem bubrega i/ili metabolita kod tretiranih i referentnih grupa;

- određivanjem površine ispod krive koncentracija u plazmi/vreme između supstance i/ili metabolita i poređenju sa podacima dobijenim od referentne grupe.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XIII** U ovoj metodi referentna grupa je ona kod koje je supstanca koja se ispituje primenjena drugim putem koji omogućuje potpunu bioraspoloživost doze.

*1.6.3.2. Raspodela*

Postoje dva pristupa, od kojih se jedan ili oba mogu koristiti za analizu oblika raspodele:

- korisni kvalitativni podaci dobijaju se korišćenjem autoradiografskih tehnika na celom telu;

- kvantitativni podaci dobijaju se lišavanja života na human način u različito vreme posle ekspozicije i određivanja koncentracije i količine ispitivane supstance i/ili metabolita u tkivima i organima.

*1.6.3.3. Izlučivanje*

Kod ispitivanja izlučivanja skupljaju se mokraća, stolica i izdahnuti vazduh, a u nekim slučajevima i žuč. Količina ispitivane supstance i/ili metabolita u tim izlučevinama meri se više puta posle izlaganja ili dok se oko 95% primenjene doze ne izluči ili tokom sedam dana (ukoliko izlučivanje 95% doze traje duže).

U posebnim slučajevima se uzima u obzir izlučivanje ispitivane supstance u mleku eksperimentalnih životinja koje doje.

*1.6.3.4. Metabolizam*

Pogodnim tehnikama analiziraju se biološki uzorci da bi se utvrdio stepen i tip metabolizma. Ukoliko je potrebno dati odgovore na pitanja koja su proizašla iz prethodnih toksikoloških studija, potrebno je razjasniti strukturu metabolita i predložiti odgovarajuće metaboličke puteve. Korisno je obaviti *in vitro* ispitivanje kako bi se dobili podaci o metaboličkim putevima.

Dodatni podaci o odnosu metabolizma i toksičnosti mogu se dobiti biohemijskim studijama, kao što je određivanje efekata na sisteme enzima koji učestvuju u metabolizmu, smanjenje endogenih neproteinskih sulfidrilnih jedinjenja i vezivanje supstance za makromolekule.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno, u skladu sa tipom izvedene studije, a gde je potrebno, daje se i grafička prezentacija. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se srednja vrednost i statističke varijacije merenja u odnosu na vreme, doziranje, tkiva i organe, kada odgovara. Potrebno je odrediti stepen apsorpcije i količinu i brzine izlučivanja odgovarajućim metodama. Kada se obavljaju ispitivanja metabolizma, navodi se struktura utvrđenih metabolita i mogući metabolički put.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

U skladu sa tipom izvedenog ispitivanja, izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži podatke o:

- vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani;

- karakterizaciji obeleženih materijala, ako su upotrebljeni;

- nivoima doza i intervalima davanja;

- putu primene i, ako je korišćen, o vehikulumu;

- toksičnim i drugim uočenim efektima;

- metodi određivanja ispitivane supstance i/ili metabolita u biološkim uzorcima, uključujući izdahnuti vazduh;

- tabele merenja po polu, dozi, režimu, vremenu, tkivima i organima;

- prikaz stepena apsorpcije i izlučivanja tokom vremena;

- metodi za karakterizaciju i identifikaciju metabolita u biološkim uzorcima;

- metodi bioloških merenja u vezi sa metabolizmom;

- predloženim putevima metabolizma;

- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

*3.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Videti Opšti uvod.

**4. LITERATURA**

Videti Opšti uvod.

**B.37. ODLOŽENA NEUROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SUPSTANCI POSLE AKUTNOG IZLAGANJA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

U proceni i evaluaciji toksičnih efekata supstanci važno je uzeti u obzir potencijal posebnih grupa supstanci da uzrokuju specifične vrste neurotoksičnosti koje ne moraju da budu otkrivene u drugim studijama toksičnosti. Uočeno je da određene organofosforne supstance uzrokuju odloženu neurotoksičnost i smatraju se kandidatima za ocenjivanje.

Za identifikaciju supstanci koje mogu da uzrokuju odloženu polineuropatiju mogu se primeniti *in vitro* skrining testovi. Negativni rezultati *in vitro* studija ne daju dokaze da ispitivana supstanca nije neurotoksična.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Organofosforne supstance uključuju nejonizovane organofosforne estre, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosforaste ili organofosfamidne kiseline ili slične tiofosfornoj, tiofosforastoj ili tiofosfamidnoj kiselini ili druge supstance koje mogu da uzrokuju odloženu neurotoksičnost koja se ponekad javlja kod ovih grupa supstanci.

Odložena neurotoksičnost jeste sindrom koji se povezuje sa produženim odloženim nastupanjem ataksije, distalne aksonopatije u kičmenoj moždini i perifernim živcima i inhibicijom i starenjem ciljne esteraze neuropatije (u daljem tekstu: NTE) u nervnom tkivu.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance mogu da se ispituju sa pozitivnom kontrolnom grupom kao sredstvo koje pokazuje da se pod laboratorijskim uslovima odgovor ispitivanih životinjskih vrsta nije značajno promenio.

Primer široko korišćene neurotoksične supstance je tri-o-tolil fosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS nomenklatura: tris (2-metilfenil)estar fosforne kiseline, takođe poznat kao tris-o-krezilfosfat.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca primenjuje se oralno u jednoj dozi domaćim kokoškama koje su zaštićene od akutnih holinergičkih efekata, kada odgovara. Životinje se posmatraju 21 dan kako bi se uočile abnormalnosti u ponašanju, ataksija i paraliza. Na kokoškama nasumično izabranim iz svake grupe izvode se biohemijska merenja, posebno NTE, obično 24 i 48 sata posle doziranja. Dvadeset i jedan dan posle izlaganja preostale kokoške se lišavaju života na human način i izvode se histopatološki pregled odabranih nervnih tkiva.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Pripreme**

Zdrave mlade kokoške bez virusnih bolesti koje mogu da interferiraju, koje ne primaju lekove i bez abnormalnosti slučajnim izborom se uvršćuju u tretirane i kontrolne grupe i aklimatizuju na laboratorijske uslove najmanje pet dana pre početka studije.

Koriste se kavezi ili zatvoreni prostori koji su dovoljno veliki za slobodno kretanje i lako posmatranje hoda.

Doziranje ispitivane supstance obično je oralnim putem prisilnim hranjenjem, gel kapsulama ili sličnom metodom. Tečnosti se daju nerazblažene ili rastvorene u odgovarajućem vehikulumu kao što je kukuruzno ulje. Čvrste supstance se, ako je moguće, rastvaraju, jer velike doze čvrstih supstanci u gel kapsulama ne mogu efikasno da se apsorbuju. Za vehikulume različite od vode moraju biti poznate toksične karakteristike, a ukoliko nisu poznate, iste se određuju pre ispitivanja.

**1.5.2. Uslovi ispitivanja**

*1.5.2.1. Eksperimentalne životinje*

Preporučuje se mlada odrasla domaća kokoška (Gallus gallus domestícus), stara 8 do 12 meseci. Koriste se vrste i sojeve standardne veličine. Kokoške se gaje u uslovima koji im omogućavaju slobodno kretanje.

*1.5.2.2. Broj i pol*

Pored tretirane grupe koristi se kontrolna grupa vehikuluma i grupa pozitivne kontrole. Sa kontrolnom grupom vehikuluma postupa se isto kao i sa tretiranom grupom, osim što se izostavlja primena ispitivane supstance.

Koristi se dovoljan broj kokoški u svakoj grupi kako bi se omogućilo lišavanja života na human način najmanje šest ptica za biohemijska određivanja (po tri u svakoj od dve vremenske tačke) i da šest ptica može da preživi 21-dnevni period praćenja posle tretmana za patologiju.

Grupa pozitivne kontrole može da se vodi istovremeno ili to može da bude nedavna kontrolna grupa iz ranije studije. Ona sadrži najmanje šest kokoški tretiranih s poznatim neurotoksikantom sa odloženim dejstvom: tri kokoši za biohemiju i tri za patologiju. Preporučljivo je periodično ažuriranje podataka iz ranije studije. Novi podaci pozitivne kontrole razvijaju se kad laboratorija koja izvodi ispitivanje promeni neki osnovni element (npr. soj, hrana, uslovi smeštaja).

*1.5.2.3. Dozni nivoi*

Obavlja se preliminarna studija uz korišćenje odgovarajućeg broja kokoški i grupa doznih nivoa kako bi se utvrdio nivo koji će se koristiti u glavnoj studiji. Određena smrtnost je neophodna u ovoj preliminarnoj studiji kako bi se definisala adekvatna doza za glavnu studiju. Može se koristiti atropin ili drugi zaštitni agens za koji se zna da ne utiče na odložene neurotoksične efekte da bi se sprečila smrt zbog akutnih holinergičkih efekata. Mogu se koristiti različite eksperimentalne metode kako bi se procenila maksimalna doza ispitivanih supstanci koja ne izaziva smrt (videti metodu B.1*bis* koja je data u ovom prilogu). Raniji podaci o kokoški ili drugi toksikološki podaci takođe mogu biti korisni u izboru doze.

Dozni nivo ispitivane supstance u glavnoj studiji je najveći mogući uzimajući u obzir rezultate studije preliminarnog izbora doze i gornju granicu doze od 2.000 mg/kg TM. Bilo koja smrtnost do koje može doći ne ometa preživljavanje dovoljnog broja životinja za biohemijska (šest) i histološka (šest) ispitivanja posle 21 dana. Koriste se atropin ili drugi zaštitni agens za koji se zna da ne utiče na odložene neurotoksične efekte kako bi se sprečila smrt usled akutnih holinergičkih efekata.

*1.5.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ukoliko ispitivanje pri doznom nivou od najmanje 2.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem postupaka opisanih u ovoj studiji, ne pokaže nikakve toksične efekte i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, nije neophodna studija koja koristi veće doze. Ispitivanje granične doze se ne primenjuje kada ljudsko izlaganje ukazuje na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze.

*1.5.2.5. Period posmatranja*

Period posmatranja je 21 dan.

**1.5.3. Postupak**

Posle primene zaštitnog agensa kako bi se sprečila smrt zbog akutnih holinergičkih efekata, ispitivana supstanca daje se u jednoj dozi.

*1.5.3.1. Opšta posmatranja*

Posmatranja se započinju odmah po izlaganju. Sve kokoške se pažljivo pregledaju nekoliko puta tokom prva dva dana, a posle toga najmanje jednom dnevno u periodu od 21 dan ili do predviđenog lišavanja života na human način. Beleže se sve znaci toksičnosti, uključujući vreme nastanka, vrstu, ozbiljnost i trajanje abnormalnosti ponašanja. Ataksija se meri ordinalnom skalom za ocenjivanje koja se sastoji od najmanje četiri nivoa, a paraliza se registruje. Najmanje dva puta nedeljno kokoške odabrane za patološka ispitivanja vade se iz kaveza i izlažu prisilnoj motoričkoj aktivnosti određeni period, kao što je penjanje po merdevinama, kako bi se zapazili minimalni toksični efekti. Životinje na samrti i životinje koje trpe ozbiljan stres ili bol uklanjaju se kada se ove pojave primete, lišavaju ih života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.5.3.2. Telesna masa*

Pre primene ispitivane supstance meri se telesna masa svim kokoškama, a posle toga najmanje jednom nedeljno.

*1.5.3.3. Biohemijska ispitivanja*

Šest slučajno izabranih kokoški iz svake tretirane i kontrolne grupe vehikuluma i tri kokoške iz grupe pozitivne kontrole (kad se takva grupa istovremeno vodi) lišavaju se života na human način u nekoliko dana posle doziranja. Osim toga, priprema se i ispituje mozak i lumbalna kičmena moždina na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Može da bude korisno da se pripremi i ispita tkivo išijadičnog nerva na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Obično, tri ptice iz kontrolne i svake tretirane grupe lišavaju se života na human način se posle 24 sata i tri ptice posle 48 sati, pri čemu se tri kokoške iz grupe pozitivne kontrole lišavaju života posle 24 sata. Ukoliko opažanje kliničkih znakova intoksikacije (ovo često može biti procenjeno posmatranjem trenutka nastupa holinergičkih znakova) pokazuje da se toksični agens distribuira vrlo polako, može biti poželjno uzorkovati tkivo iz tri ptice u oba navrata između 24 sata i 72 sata posle doziranja.

Analiza acetilholinesteraze (u daljem tekstu: AChE) može da se obavi na tim uzorcima, ako se to smatra odgovarajućim. Može da se dogodi *in vivo* spontana reaktivacija AChE i da dovede do podcenjivanja potentnosti supstance kao AChE inhibitora.

*1.5.3.4. Postmortalni pregled*

Postmortalni pregled svih životinja (planirano lišenih života na human način ili lišenih života na samrti) uključuje posmatranje izgleda mozga i kičmene moždine.

*1.5.3.5. Histopatološka ispitivanja*

Nervno tkivo životinja koje prežive period posmatranja i koje se ne koristi za biohemijske studije podvrgava se mikroskopskom pregledu. Tkiva se fiksiraju *in situ,* korišćenjem tehnika perfuzije. Preseci uključuju mali mozak (srednji longitudinalni nivo), produženu moždinu, kičmenu moždinu i periferne živce. Preseci kičmene moždine se uzimaju iz gornjeg cervikalnog segmenta, srednje torakalone i lumbo-sakralne regije. Uzimaju se preseci distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana do gastroknemijusnog mišića i skijatičnog živca. Preseci se boje odgovarajućim mijelin i akson-specifičnim bojama.

**2. PODACI**

Negativni rezultati efekata izabranih za posmatranje u ovoj metodi (biohemijska, histopatološka ispitivanja i posmatranje ponašanja) ne zahtevaju dalje ispitivanje odložene neurotoksičnosti. Dvosmisleni ili neuverljivi rezultati za ove efekte mogu zahtevati dalje ocenjivanje.

Navode se pojedinačni podaci. Svi podaci navode se tabelarno. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje pokazuju oštećenja, bihevioralne ili biohemijske efekte, tipovi i ozbiljnost tih oštećenja ili efekata i procenat životinja koje pokazuju svaki tip i ozbiljnost oštećenja ili efekta.

Nalaze ove studije se ocenjuje u smislu incidence, ozbiljnosti i korelacije bihevioralnih, biohemijskih i histopatoloških efekata i drugih opaženih efekata u tretiranim i kontrolnim grupama.

Numeričke rezultate se ocenjuju odgovarajućim i prihvaćenim statističkim metodama. Statističke metode se biraju prilikom osmišljavanja studije.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćeni soj;

- broj i starost životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, itd.;

- individualne telesne mase životinja na početku ispitivanja.

2) Uslovima ispitivanja:

- detalji o preparatu ispitivane supstance, stabilnost i homogenost, kad odgovara;

- opravdanje izbora vehikuluma;

- detalji o primeni ispitivane supstance;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- obrazloženje izbora doze;

- specifikacija primenjenih doza uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primenjenog materijala;

- identitet i detalji o primeni svakog zaštitnog agensa.

3) Rezultatima:

- podaci o telesnoj masi;

- podaci o toksičnom odgovoru po grupi, uključujući mortalitet;

- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);

- detaljan opis biohemijskih metoda i nalaza;

- nalazi obdukcije;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- statistička obrada rezultata, kada odgovara.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Zaključcima.

**B.38. ISPITIVANJE ODLOŽENE NEUROTOKSIČNOSTI ORGANOFOSFORNIH SUPSTANCI - PONOVLJENE DOZE, 28 DANA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

U proceni i evaluaciji toksičnih efekata supstanci važno je uzeti u obzir potencijal posebnih grupa supstanci da uzrokuju specifične vrste neurotoksičnosti koje ne moraju da budu otkrivene u drugim studijama toksičnosti. Uočeno je da određene organofosforne supstance uzrokuju odloženu neurotoksičnost i smatraju se kandidatima za ocenjivanje.

Za identifikaciju supstanci koje mogu da uzrokuju odloženu polineuropatiju mogu se primeniti *in vitr*o skrining testovi. Negativni rezultati *in vitro* studija ne daju dokaze da ispitivana supstanca nije neurotoksična.

Ovo 28-dnevno ispitivanje odložene neurotoksičnosti daje podatke o mogućim rizicima po zdravlje koji mogu proizaći iz ponovljenog izlaganja tokom ograničenog vremenskog perioda. Ispitivanje obezbeđuje podatke o dozi-efektu i može dati procenu doze bez efekta koja može da bude korisna pri utvrđivanju kriterijuma bezbednosti za ekspoziciju.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Organofosforne supstance uključuju nejonizovane organofosforne estre, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosforaste ili organofosfamidne kiseline ili slične tiofosfornoj, tiofosforastoj ili tiofosfamidnoj kiselini ili druge supstance koje mogu da uzrokuju odloženu neurotoksičnost koja se ponekad javlja kod ovih grupa supstanci.

Odložena neurotoksičnost jeste sindrom koji se povezuje sa produženim odloženim nastupanjem ataksije, distalne aksonopatije u kičmenoj moždini i perifernim živcima i inhibicijom i starenjem ciljne esteraze neuropatije (u daljem tekstu: NTE) u nervnom tkivu.

*1.3. PRINCIP METODE*

Dnevne doze ispitivane supstance primenjuju se oralno domaćim kokoškama tokom 28 dana. Životinje se najmanje jednom dnevno posmatraju zbog abnormalnosti u ponašanju, ataksije i paralize i to do 14 dana posle zadnje doze. Obavljaju se biohemijska merenja, posebno NTE na slučajno odabranim kokoškama iz svake grupe, obično 24 i 48 sata posle poslednje doze. Dve nedelje posle zadnje doze preostale kokoške se lišavaju života na human način i obavlja se histopatološki pregled odabranih nervnih tkiva.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

Najmanje pet dana pre početka studije zdrave mlade kokoške bez virusnih bolesti koje mogu da interferiraju, koje ne primaju lekove i bez abnormalnosti slučajnim izborom se uvršćuju u tretirane i kontrolne grupe i aklimatizuju na laboratorijske uslove.

Koriste se kavezi ili zatvoreni prostori koji su dovoljno veliki za slobodno kretanje i lako posmatranje hoda.

Doziranje ispitivane supstance je oralnim putem sedam dana u nedelji prisilnim hranjenjem, gel kapsulama ili sličnom metodom. Tečnosti se daju nerazblažene ili rastvorene u odgovarajućem vehikulumu kao što je kukuruzno ulje. Čvrste supstance se, ako je moguće, rastvaraju, jer velike doze čvrstih supstanci u gel kapsulama ne mogu efikasno da se apsorbuju. Za vehikulume različite od vode moraju da budu poznate toksične karakteristike, a ukoliko nisu poznate, iste se određuju pre ispitivanja.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Eksperimentalne životinje*

Preporučuje se mlada odrasla domaća kokoška (Gallus gallus domestícus), stara 8 do 12 meseci. Koriste se vrste i sojevi standardne veličine. Kokoške se gaje u uslovima koji im omogućavaju slobodno kretanje.

*1.4.2.2. Broj i pol*

Koriste se najmanje tri tretirane grupe i kontrolna grupa u vehikuluma. Sa kontrolnom grupom vehikuluma postupa se isto kao i sa tretiranom grupom, osim što se izostavlja primena ispitivane supstance.

Koristi se dovoljan broj kokoški u svakoj grupi kako bi se omogućilo lišavanje života na human način najmanje šest ptica za biohemijska određivanja (po tri u svakoj od dve vremenske tačke) i da šest ptica može da preživi 14-dnevni period praćenja posle tretmana za patološka ispitivanja.

*1.4.2.3. Dozni nivoi*

Dozni nivoi se biraju uzimajući u obzir rezultate akutnog ispitivanja odložene neurotoksičnosti i postojeće podatke o toksičnosti ili kinetici koji su dostupni za ispitivanu supstancu. Najviši dozni nivo određuje se sa ciljem izazivanja toksičnih efekata, najbolje odložene neurotoksičnosti, ali ne smrti niti očigledne patnje. Zatim se bira opadajući niz nivoa doza kako bi se pokazao bilo koji odgovor povezan sa doziranjem i nepostojanje štetnih efekata pri najnižem doznom nivou.

*1.4.2.4. Ispitivanje granične doze*

Ukoliko ispitivanje pri doznom nivou od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem postupaka opisanih u ovoj studiji, ne pokaže nikakve toksične efekte i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, nije neophodna studija koja koristi veće doze. Ispitivanje granične doze se ne primenjuje kada izlaganje ljudi ukazuje na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze.

*1.4.2.5. Period posmatranja*

Sve životinje se posmatraju najmanje jednom dnevno tokom perioda izlaganja i 14 dana posle toga, sve do planiranog lišavanja života na human način.

**1.4.3. Postupak**

Životinje se doziraju ispitivanom supstancom sedam dana u nedelji kroz period od 28 dana.

*1.4.3.1. Opšta posmatranja*

Posmatranja se započinju odmah po izlaganju. Sve kokoške se pažljivo pregledaju najmanje jednom dnevno u periodu od 28 dana tretmana i 14 dana posle doziranja ili do planiranog lišavanja života na human način. Beleže se svi znakovi toksičnosti, uključujući vreme nastanka, vrstu, ozbiljnost i trajanje. Posmatranja uključuju, ali nisu ograničena na, abnormalnosti u ponašanju. Ataksija se meri ordinalnom skalom za ocenjivanje koja se sastoji od najmanje četiri nivoa. Registruje se paralizu. Najmanje dva puta nedeljno kokoške odabrane za patološka ispitivanja se vade iz kaveza i izlažu prisilnoj motoričkoj aktivnosti određeni period, kao što je penjanje po merdevinama, kako bi se zapazili minimalni toksični efekti. Životinje na samrti i životinje koje trpe ozbiljan stres ili bol uklanjaju se kada se primete ove pojave, lišavaju se života na human način i postmortalno pregledaju.

*1.4.3.2. Telesna masa*

Svim kokoškama se meri telesna masa pre primene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno posle toga.

*1.4.3.3. Biohemijska ispitivanja*

Šest slučajno odabranih kokošaka iz svake tretirane i kontrolne grupe vehikuluma lišavaju se života na human način nekoliko dana nakon poslednje doze. Priprema se i ispituje mozak i lumbalna kičmena moždina na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Može biti korisno pripremiti i ispitati tkivo išijadičnog nerva na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Tri ptice iz kontrolne i svake tretirane grupe lišavaju se života na human način posle 24 sata i tri ptice 48 sati posle zadnjeg doziranja. Ukoliko podaci iz akutne studije ili drugih studija (npr. toksikokinetike) ukazuju da su druge vremenske tačke posle zadnjeg doziranja pogodnije, primenjuju se te tačke, a obrazloženje se dokumentuje.

Analiza acetilholinesteraze (u daljem tekstu: AChE) može se obaviti na tim uzorcima, ako se to smatra odgovarajućim. Može se dogoditi *in vivo* spontana reaktivacija AChE i dovesti do podcenjivanja potentnosti supstance kao AChE inhibitora.

*1.4.3.4. Postmortalni pregled*

Postmortalni pregled svih životinja (planirano lišenih života na human način ili lišenih života na samrti) uključuje posmatranje izgleda mozga i kičmene moždine.

*1.4.3.5. Histopatološka ispitivanja*

Nervno tkivo životinja koje prežive period posmatranja i koje se ne koristi za biohemijska ispitivanja podvrgava se mikroskopskom pregledu. Tkiva se fiksiraju in situ, korišćenjem tehnika perfuzije. Preseci uključuju mali mozak (srednji longitudinalni nivo), produženu moždinu, kičmenu moždinu i periferne živce. Preseci kičmene moždine se uzimaju iz gornjeg cervikalnog segmenta, srednje torakalone i lumbo-sakralne regije. Uzimaju se preseci distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana do gastroknemijusnog mišića i skijatičnog živca. Preseci se boje odgovarajućim mijelin i akson-specifičnim bojama. Izvodi se mikroskopski pregled na očuvanim tkivima svih životinja u kontrolnoj i tretiranoj grupi kojoj je davana visoka doza. Kada postoje dokazi za efekte kod grupe visoke doze, obavlja se mikroskopski pregled kod kokoški iz grupa srednje i niže doze.

**2. PODACI**

Negativni rezultati efekata izabranih za posmatranje u ovoj metodi (biohemijska, histopatološka ispitivanja i posmatranje ponašanja) obično ne zahtevaju dalje ispitivanje odložene neurotoksičnosti. Dvosmisleni ili neuverljivi rezultati za ove efekte mogu zahtevati dalje ocenjivanje.

Podaci se navode pojedinačno i to tabelarno. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje pokazuju oštećenja, bihevioralne ili biohemijske efekte, tipovi i ozbiljnost tih oštećenja ili efekata i procenat životinja koje pokazuju svaki tip i ozbiljnost oštećenja ili efekta.

Nalazi ove studije ocenjuju se u smislu incidence, ozbiljnosti i korelacije bihevioralnih, biohemijskih i histopatoloških efekata i drugih opaženih efekata u tretiranim i kontrolnim grupama.

Numerički rezultati ocenjuju se odgovarajućim i prihvaćenim statističkim metodama. Statističke metode se biraju prilikom osmišljavanja studije.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćeni soj;

- broj i starost životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, itd.;

- individualne telesne mase životinja na početku ispitivanja.

2) Uslovima ispitivanja:

- detalji o preparatu ispitivane supstance, stabilnost i homogenost, kad odgovara;

- opravdanje izbora vehikuluma;

- detalji o primeni ispitivane supstance;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- obrazloženje izbora doze;

- specifikacija primenjenih doza uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primenjenog materijala;

- opravdanje izbora drugih vremenskih tačaka za biohemijska određivanja, ukoliko vreme nije 24 sata i 48 sati.

3) Rezultatima:

- podaci o telesnoj masi;

- podaci o toksičnom odgovoru po grupi, uključujući mortalitet;

- doza bez štetnog dejstva;

- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);

- detaljan opis biohemijskih metoda i nalaza;

- nalazi obdukcije;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;

- statistička obrada rezultata, kad odgovara.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Zaključcima.

**B.39. ISPITIVANJE VANREDNE SINTEZE DNK (UDS)   
NA ĆELIJAMA JETRE SISARA *IN VIVO***

**1. METODE ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 486, Unscheduled DNK Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In vivo* (1997).

*1.1. UVOD*

Svrha ispitivanja vanredne sinteze DNK (u daljem tekstu: UDS) na ćelijama jetre sisara *in vivo* je identifikacija ispitivanih supstanci koje uzrokuju popravku DNK u ćelijama jetre tretiranih životinja **1,2,3,4**.

Ovo *in vivo* ispitivanje daje metodu za istraživanje genotoksičnih efekata hemikalija u jetri. Krajnji efekat koji se meri je indikativan za oštećenje DNK i kasniju popravku u ćelijama jetre. Jetra je obično glavno mesto metabolizma apsorbovanih supstanci, pa je to odgovarajuće mesto za merenje oštećenja DNK *in vivo*.

Nije prikladno koristiti ovo ispitivanje ukoliko postoje dokazi da ispitivana supstanca neće dospeti u ciljno tkivo.

Krajnji efekat UDS meri se određivanjem preuzimanja označenih nukleozida u ćelije koje ne prolaze kroz redovnu (u s-fazi) DNK sintezu. Tehnika koja se najviše koristi je određivanje preuzimanja timidina označenog tricijumom (u daljem tekstu: 3H-TdR) autoradiografijom. Jetre pacova se najviše koriste za *in vivo* UDS ispitivanja. Mogu se koristiti i druga tkiva osim jetre, ali nisu predmet ove metode.

Detekcija UDS efekta zavisi od broja DNK baza koje su uklonjene i zamenjene na mestu oštećenja. UDS ispitivanje je posebno koristan za detektovanje "dugačke popravke" (20 do 30 baza) izazvanog supstancom. Obrnuto "kratka popravka" (1 do 3 baze) detektuje se s mnogo manjom osetljivošću. Mutageni događaji mogu nastati zbog nepopravljenih, pogrešno popravljenih ili pogrešno replikovanih oštećenja DNK. Obim UDS reakcije ne daje indikacije pouzdanosti procesa oporavka. Moguće je da mutagen reaguje sa DNK, ali da se oštećenje DNK ne popravi kroz proces popravke izrezivanjem. Nedostatak specifičnih podataka o mutagenoj aktivnosti koje daje UDS ispitivanje kompenzuje se potencijalnom osetljivošću ovog krajnjeg efekta od interesa, budući da se prati celokupni genom.

Videti Opšti uvod.

*1.2. DEFINICIJE*

Ćelije u popravci jesu viša neto nuklearna zrnca od podešene vrednosti koja se opravdava u laboratoriji koja vrši ispitivanje.

Neto nuklearna zrnca (net nuclear grains, u daljem tekstu: NNG) jeste kvantitativna mera za UDS aktivnost ćelija u autoradiografskim UDS ispitivanjima, obračunata oduzimanjem prosečnog broja citoplazmatskih zrnaca u delovima citoplazme ekvivalentnim nukleusu (u daljem tekstu: CG) od broja nuklearnih zrnaca (u daljem tekstu: NG), odnosno: NNG = NG - CG. NNG broj se dobija za pojedinačne ćelije, a zatim se zbraja za ćelije u kulturi, u paralelnim kulturama, itd.

Vanredna sinteza DNK (u daljem tekstu: UDS) jeste sinteza radi popravke DNK posle uklanjanja i odstranjivanja niza DNK koji sadrži područje oštećenja koje je uzrokovano hemijskom supstancom ili fizičkim agensom.

*1.3. PRINCIP METODE*

UDS ispitivanje na ćelijama jetre sisara *in vivo* ukazuje na sintezu radi popravke DNK posle uklanjanja i odstranjivanja niza DNK koji sadrži područje oštećenja koje je uzrokovano hemijskom supstancom ili fizičkim agensom. Ispitivanje se obično zasniva na ugrađivanju 3H-TdR u DNK ćelija jetre koje imaju nisku frekvenciju ćelija u S-fazi ćelijskog ciklusa. Preuzimanje 3H-TdR određuje se autoradioografijom, budući da ova tehnika nije osetljiva na interferencije iz ćelija u S-fazi kao što je to npr. upotreba tečnog scintilacijskog brojanja.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Izbor životinjske vrste*

Obično se koriste pacovi, mada može da se koristi bilo koja vrsta sisara. Uobičajeno se koriste sojevi mladih zdravih odraslih životinja. Na početku studije varijacija u telesnoj masi životinja treba da bude minimalna i da ne prelazi ± 20% srednje telesne mase za svaki pol.

*1.4.1.2. Uslovi smeštaja i ishrane*

Primenjuju se opšti uslovi navedeni u Opštem uvodu, mada vlažnost vazduha treba da bude između 50% i 60%.

*1.4.1.3. Priprema životinja*

Zdrave mlade odrasle životinje raspoređuju se slučajnim izborom u kontrolnu i tretirane grupe. Kavezi se raspoređuju tako da se minimalizuju mogući efekti položaja kaveza. Životinje se identifikuju pojedinačno i drže u kavezima najmanje pet dana pre početka studije kako bi se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uslove.

*1.4.1.4. Ispitivana supstanca/Preparat*

Pre doziranja životinja čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim rastvaračima ili vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju. Tečne ispitivane supstance mogu da se doziraju direktno ili razblažene pre doziranja. Primenjuju se sveži preparati ispitivane supstance osim ukoliko podaci o stabilnosti ne ukazuju na prihvatljivost čuvanja.

**1.4.2. Uslovi ispitivanja**

*1.4.2.1. Rastvarač/vehikulum*

Rastvarač/vehikulum ne sme da uzrokuje toksične efekte pri korišćenim doznim nivoima i ne sme da se sumnja na hemijske reakcije sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se koriste rastvarači/vehikulumi koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje treba podupreti podacima o njihovoj kompatibilnosti. Preporučuje se da se, kad god je moguće, prvo razmotri primena vodenog rastvarača/vehikuluma.

*1.4.2.2. Kontrole*

Istovremene pozitivne i negativne kontrole (rastvarač/vehikulum) se uključuju u svaki deo eksperimenta koji se nezavisno izvodi. Osim tretmana ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi se postupa isto kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole su supstance za koje je poznato da proizvode UDS kada se primene pri nivoima izloženosti za koje se očekuje da daju uočljivo povećanje u odnosu na pozadinu. Pozitivne kontrole koje zahtevaju metaboličku aktivaciju se koriste u dozama koje izazivaju umereni efekat**4**. Doze se mogu odabrati tako da su efekti jasni ali ne otkrivaju trenutno identitet kodiranih slajdova onome koji čita. Primeri supstanci koje se mogu koristiti kao pozitivne kontrole:

Tabela 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Vreme uzorkovanja | Supstanca | CAS br. | EINECS br |
| Rano uzorkovanje  (2 do 4 sata) | N-nitrozodimetilamin | 62-75-9 | 200-249-8 |
| Kasno  uzorkovanja (12 do 16 sati) | N-2-fluorenilacetamid (2-AAF) | 53-96-3 | 200-188-6 |

Mogu se koristiti i druge odgovarajuće supstance kao pozitivne kontrolne. Prihvatljivo je da se pozitivna kontrola primeni drugačijim putem od ispitivane supstance.

*1.5. POSTUPAK*

**1.5.1. Broj i pol životinja**

Koristi se odgovarajući broj životinja kako bi se uzele u obzir prirodne biološke varijacije u efektu ispitivanja. Broj životinja je najmanje tri životinje po grupi koje se mogu analizirati. Tamo gde je akumulirana značajna istorijska baza podataka potrebne su samo jedna ili dve životinje za istovremene negativne i pozitivne kontrolne grupe.

Ukoliko u vreme studije postoje raspoloživi podaci iz studija za iste vrste i korišćenje istog puta izlaganja koje pokazuju da ne postoje bitne razlike u toksičnosti među polovima, dovoljno je ispitivanje na samo jednom polu, prevashodno na mužjacima. Ako je ljudsko izlaganje hemikalijama specifično za pol, kao što je to npr. s nekim farmaceutskim agensima, ispitivanje se obavlja na životinjama odgovarajućeg pola.

**1.5.2. Raspored tretmana**

Ispitivane supstance se obično primenjuju kao jedan tretman.

**1.5.3. Dozni nivoi**

Uobičajeno se koriste najmanje dva dozna nivoa. Najviša doza se definiše kao doza koja uzrokuje znakove toksičnosti koji su takvi da bi se za više nivoe doza, zasnovane na istom režimu doziranja, očekivalo da uzrokuju smrtnost. Niža doza treba da bude 50% do 25% više doze.

Supstance sa specifičnim biološkim aktivnostima pri niskim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) mogu da budu izuzeci od kriterijuma za određivanje doza i ocenjuju se od slučaja do slučaja. Ukoliko se obavlja studija nalaženja raspona, jer nisu raspoloživi odgovarajući podaci, izvodi se u istoj laboratoriji uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima tretiranja kao i u glavnoj studiji.

Najviša doza se može definisati i kao doza koja proizvodi određene indikacije toksičnosti u jetri (npr. piknotički nukleusi).

**1.5.4. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko ispitivanje korišćenjem doze od najmanje 2.000 mg/kg TM primenjene u jednom tretmanu ili u dva tretmana istog dana ne pokaže toksične efekte i ukoliko genotoksičnost nije očekivana na osnovu podataka iz strukturno sličnih supstanci, nije neophodna potpuna studija. Očekivano izlaganje ljudi može da ukaže na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze u ispitivanju granične doze.

**1.5.5. Primena doza**

Ispitivana supstanca se primenjuje pomoću gastrične cevi ili prikladnim instrumentom za intubaciju. Drugi putevi izlaganja mogu biti prihvatljivi ako se mogu opravdati. Ne preporučuje se intraperitonealni način, budući da jetra može da se izloži ispitivanoj supstanci direktno, a ne preko cirkulacionog sistema. Maksimalna zapremina tečnosti koja može prisilno da se primeni ili ubrizga odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Ova zapremina ne sme da prelazi 2 ml/100g TM. Korišćenje većih zapremina mora biti opravdano. Osim kod iritabilnih ili korozivnih supstanci koje uobičajeno pokazuju lošije efekte pri višim koncentracijama, varijabilnost u ispitivanoj zapremini se minimalizuje prilagođavanjem koncentracije kako bi se obezbedila stalna zapremina pri svim nivoima doza.

**1.5.6. Priprema ćelija jetre**

Ćelije jetre pripremaju se od tretiranih životinja obično 12 do 16 sati posle doziranja. Uglavnom je neophodno dodatno ranije vreme uzorkovanja (obično 2 do 4 sata posle tretmana), osim ukoliko postoji jasan pozitivni efekat unutar 12 do 16 sati. Alternativno vreme uzorkovanja može se koristiti kad je to opravdano na osnovu toksikokintičkih podataka.

Kratkotrajne kulture ćelija jetre sisara obično se dobijaju perfuzijom jetre *in situ* kolagenazom i omogućavanjem sveže odvojenim ćelijama jetre da se pričvrste na prikladnu podlogu. Ćelije jetre životinja negativne kontrole imaju vijabilitet**5** od najmanje 50%.

**1.5.7. Određivanje UDS**

Sveže izolovane ćelije jetre sisara inkubiraju se sa medijumom koji sadrži 3H-TdR tokom odgovarajućeg vremenskog perioda, npr. 3 do 8 sati. Na kraju perioda inkubacije medijum se uklanja od ćelija koje se tada mogu inkubirati sa medijmom koji sadrži višak neoznačenog timidina kako bi se izbegla neugrađena radiooaktivnost ("hladna potraga"). Ćelije se zatim ispiraju, fiksiraju i suše. Hladna potraga nije neophodna za produžena vremena inkubacije. Slajdovi se potapaju u autoradiografsku emulziju, izlažu u mraku (npr. u frižideru 7 do 14 dana), razvijaju, boje i izložena srebrna zrnca se prebrojavaju. Od svake životinje priprema se dva do tri slajda.

**1.5.8. Analiza**

Preparati slajdova sadrže dovoljno ćelija normalne morfologije kako bi se omogućilo značajno ocenjivanje UDS. Preparati se mikroskopski ispituju na znake očigledne citotoksičnosti (npr. piknoza, smanjen nivo radio označavanja).

Slajdovi se kodiraju pre prebrojavanja zrnaca. Obično se dobije 100 ćelija od svake životinje u najmanje dva slajda. Manje od 100 ćelija po životinji, se obrazlaže. Ne prebrojavaju za nukleusi S-faze, već se beleži razmera S-faze.

Količina ugrađenih 3H-TdR u jedru i citoplazmi morfološki normalnih ćelija, dokazana taloženjem (deposition) srebrnih zrnaca, utvrđuje se odgovarajućim metodama.

Broj zrnaca se određuje po jedru (nuklearna zrnca, u daljem tekstu: NG) i jedru - ekvivalentnim područjima po citoplazmi (citoplazmatska zrnca, u daljem tekstu: CG). Broj CG se meri uzimanjem najviše označenog područja citoplazme ili uzimanjem proseka dva ili tri broja citoplazmatskih zrnaca u poređenju sa jedrom. Druge metode prebrojavanja (npr. brojavanje celih ćelija) mogu se koristiti ako je to opravdano**6**.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Navode se podaci o pojedinačnim slajdovima i životinjama. Svi podaci se navode tabelarno. Neto nuklearna zrnca (u daljem tekstu: NNG) se izračunavaju za svaku ćeliju, za svaku životinju i svaku dozu i vreme, i to oduzimanjem broja CG od broja NG. Ukoliko se broje "ćelije u oporavku", kriterijumi za definisanje "ćelija u oporavku" se obrazlažu i zasnivaju na podacima negativne kontrole ranije ili konkurentne studije. Numerički rezultati mogu biti ocenjeni statističkim metodama. Ukoliko se koriste statističke metode, biraju se i opravdavaju pre izvođenja studije.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Kriterijumi za pozitivne odgovore uključuju:

a) NNG vrednosti iznad prethodno zadatog praga, a što je opravdano na osnovu laboratorijskih istorijskih podataka ili

b) NNG vrednosti koje su značajno veće nego istovremena kontrola.

Kriterijumi za negativne odgovore uključuju:

a) NNG vrednosti u okviru/ispod istorijskog praga kontrole ili

b) NNG vrednosti koje nisu značajno veće od istovremene kontrole.

Potrebno je razmotriti biološku relevantnost podataka, odnosno parametre kao što su međuživotinjska varijacija, odnos doza-odgovor, a uzima se u obzir i citotoksičnost. Pri ocenjivanju rezultata ispitivanja mogu se koristiti statističke metode. Statistički značaj ne treba da bude jedini određujući faktor za pozitivni odgovor.

Većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u retkim slučajevima podaci onemogućuju definitivnu ocenu o aktivnosti ispitivane supstance. Rezultati mogu ostati dvosmisleni ili sumnjivi bez obzira na broj ponavljanja eksperimenta.

Pozitivni rezultat UDS ispitivanja na ćelijama jetre sisara *in vivo* ukazuje da ispitivana supstanca uzrokuje oštećenje DNK u ćelijama jetre sisara *in vivo* koje se može popraviti vanrednom sintezom DNK *in vitro*. Negativni rezultat ukazuje da, pod uslovima ispitivanja, ispitivana supstanca ne uzrokuje oštećenja DNK koja su uočljiva ovim ispitivanjem.

Treba prodiskutovati verovatnoću da ispitivana supstanca dospe u sistemsku cirkulaciju ili specifično u ciljano tkivo (npr. sistemska toksičnost).

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Rastvaraču/vehikulumu:

- opravdanje za izbor vehikuluma;

- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u rastvaraču/vehikulumu, ukoliko je poznato.

2) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, ishrana, itd.;

- individualna telesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon telesne mase, srednju vrednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:

- pozitivne i negativne kontrole vehikuluma/rastvarača;

- podaci iz studije traženja raspona, ukoliko je obavljena;

- obrazloženje izbora nivoa doza;

- detalji o preparatu ispitivane supstance;

- detalji o primeni ispitivane supstance;

- obrazloženje puta primene;

- metode provere da je ispitivani agens dospeo do sistemske cirkulacije ili ciljnog tkiva, ukoliko je primenjivo;

- konverzija iz koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do stvarne doze (mg/kg telesna masa/dan), ukoliko je primenjivo;

- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- detaljan opis tretmana i uzorkovanja;

- metode merenja toksičnosti;

- metode pripreme ćelija jetre i kultura;

- korišćena autoradiografska tehnika;

- broj pripremljenih slajdova i broj prebrojanih ćelija;

- kriterijumi ocenjivanja;

- kriterijumi da je ispitivanje pozitivno, negativno ili dvosmisleno.

4) Rezultatima:

- individualni slajd, srednje vrednosti po životinji i grupi za nuklearna zrnca, citoplazmatska zrnca, ineto nuklearna zrnca;

- odnos doza-efekat, ukoliko je dostupan;

- statistička ocena, ukoliko postoji;

- znaci toksičnosti;

- podaci o istovremenoj negativnoj (rastvarač/vehikulum) i pozitivnoj kontroli;

- istorijski podaci o negativnoj (rastvarač/vehikulum) i pozitivnoj kontroli s rasponom, srednjom vrednošću i standardnim devijacijama;

- broj "ćelija u popravci" ako je utvrđen;

- broj ćelija S-faze ako je utvrđen;

- vijabilitet ćelija.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In vivo* Rat Hepatocyte DNK Repair Assay. Mutation Res., 156, 1-18.

2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, 123-133.

3. Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). *In vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and *In vivo*. Mutation Res., 312, 263-285.

5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In vivo*/*In vitro* DNK Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21-27.

6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In vivo*/*In vitro* Hepatocyte DNK Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553-562.

**B.40. *IN VITRO* ISPITIVANJE KOROZIVNOG OŠTEĆENJA KOŽE: ISPITIVANJE TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER)**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 430 (2004).

*1.1. UVOD*

Korozivno oštećenje kože odnosi se na stvaranje ireverzibilnog oštećenja tkiva u koži po nanošenju materijala koji se ispituje (kao što je definisano u GHS)**1**. Ova metoda obezbeđuje proceduru kojom se procena korozivnosti ne izvodi na živim životinjama.

Procena korozivnosti za kožu uključuje upotrebu laboratorijskih životinja**2**. Zabrinutost zbog bola i patnje životinja koje su uključene u ovaj postupak navodi se u reviziji metode V.4. koja je data u ovom prilogu, a koja dozvoljava određivanje korozivnog oštećenja kože upotrebom alternativnih, *in vitro* metoda, da bi se izbegli bol i patnja životinja.

Prvi korak ka definisanju alternativnih ispitivanja koji se mogu koristiti za ispitivanje korozivnosti za kožu u regulatorne svrhe bilo je izvođenje prevalidacionih studija**3**. Potom je izvedena**6, 7, 8** formalna validacija studija *in vitro* metoda za procenu korozivnog oštećenja kože**4, 5**. Ishod ovih studija i druga objavljena literatura doveli su do preporuke da se sledeća ispitivanja mogu koristiti za procenu *in vivo* korozivnosti za kožu**9, 10, 11**: ispitivanje sa modelom humane kože (videti metodu V.40 *bis* koja je data u ovom prilogu) i ispitivanje transkutanog električnog otpora (ova metoda).

Studija validacije i druge objavljene studije potvrđuju da je ispitivanje transkutanog električnog otpora (TER) kože pacova**12, 13** moguće pouzdano napraviti razliku između poznatih koroziva za kožu i nekoroziva**5, 9**.

Ispitivanje koje se opisuje u ovoj metodi omogućava identifikaciju korozivnih hemijskih supstanci i smeša. To dalje omogućava identifikaciju supstanci i smeša koje nisu korozivne kada je to potkrepljeno određivanjem težine dokaza korišćenjem (na osnovu) postojećih informacija (npr. pH, odnos struktura - aktivnost, humani ili životinjski podaci)**1, 2, 11, 14**. To ne daje podatak o iritaciji kože, niti dozvoljava subklasifikaciju korozivne supstance kao što je to dozvoljeno u GHS**1**.

Za potpunu procenu lokalnih efekata na koži posle jednokratnog izlaganja putem kože, preporučuje se da se prati sledeća strategija ispitivanja kao što je dodato u ispitivanju metodi V.4.**2** koja je data u ovom prilogu i kao što je dato u GHS**1**. Ova strategija ispitivanja uključuje izvođenje *in vitro* ispitivanje za korozivno oštećenje kože (kao što je opisano u ovoj metodi) i iritacije kože pre razmatranja ispitivanja na živim životinjama.

*1.2. DEFINICIJE*

Korozivno oštećenje *in vivo* jeste nastanak ireverzibilnih oštećenja kože odnosno vidljive nekroze u epidermisu i dermisu nakon četvoročasovne primene ispitivane supstance. Korozivno oštećenje kože karakteriše se prema tipu izazvanog oštećenja kao:ulkus, krvarenje ili krvave kraste i na kraju perioda posmatranja od 14 dana prema promeni boje kože uslovljene perutanjem i pojavi površina sa alopecijom i ožiljnog tkiva. U cilju procene nejasnih oštećenja obavljaju se histopatološka ispitivanja.

Transkutani električni otpor (u daljem tekstu: TER) jeste mera električne impedance kože, kao vrednost otpora u kilo omima. Jednostavna i snažna metoda procene funkcije barijere snimanjem prolaska jona kroz kožu pomoću aparature Wheatstone bridge.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Tabela 1. Referentne hemikalije

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Naziv | EINECS broj | CAS broj |  |
| 1,2-diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | jako korozivno |
| akrilna kiselina | 201-177-9 | 79-10-7 | jako korozivno |
| 2-terc- butilfenol | 201-807-2 | 88-18-6 | korozivno |
| Kalijum-hidroksid (10%) | 215-181-3 | 1310-58-3 | korozivno |
| sumporna kiselina (10%) | 231-639-5 | 7664-93-9 | korozivno |
| oktanska kiselina (kaprilna kiselina) | 204-677-5 | 124-07-02 | korozivno |
| 4-amino-1,2,4-triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | nije korozivno |
| eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | nije korozivno |
| Fenetil-bromid | 203-130-8 | 103-63-9 | nije korozivno |
| tetrahloretilen | 204-825-9 | 27-18-4 | nije korozivno |
| izostearinska kiselina | 250-178-0 | 30399-84-9 | nije korozivno |
| 4-(metiltio)-benzaldehid | 222-365-7 | 3446-89-7 | nije korozivno |

Većina navedenih hemikalija preuzeta je sa spiska hemikalija izabranih za međunarodnu studiju validacije ECVAM**4**. Njihov izbor se bazira na sledećim kriterijumima:

a) jednak broj korozivnih i nekorozivnih supstanci;

b) komercijalno dostupne supstance koje pokrivaju većinu relevantnih hemijskih klasa;

v) obuhvatanje jako korozivnih kao i manje korozivnih supstanci kako bi se omogućilo razlikovanje na osnovu korozivnog potencijala;

g) izbor hemikalija kojima se može rukovati u laboratoriji bez postavljanja drugih ozbiljnih opasnosti osim korozivnosti.

*1.4. PRINCIP METODE*

Hemikalija koja se ispituje primenjuje se do 24 sata na epidermalne površine diskova kože u sistemu za ispitivanje koji se sastoji od dve komore u kome diskovi kože funkcionišu kao pregrada između komora. Diskovi kože su uzeti od humano usmrćenih pacova starosti 28 do 30 dana. Korozivni materijali se identifikuju prema njihovom svojstvu da produkuju gubitak integriteta i zaštitne funkcije stratum corneum-a, što se meri kao smanjenje TER ispod graničnog nivoa**12**. Za TER pacova, granična vrednost od 5 kΩ izabrana je na osnovu opsežnih podataka za širok opseg hemikalija gde je velika većina vrednosti bila ili jasno dosta iznad (često > 10 kΩ ili dosta ispod (često < 3 kΩ) ove vrednosti**12**. Materijali koji nisu korozivni kod životinja ali jesu ili nisu iritabilni ne snižavaju TER ispod ove granične vrednosti. Korićenje drugih preparata kože ili druge opreme može da izmeni graničnu vrednost i zahteva dalju validaciju. Korak vezivanja boje uključen je u postupak ispitivanja za potvrdu pozitivnih rezultata TER uključujući vrednosti približne 5kΩ.

Korak vezivanja boje određuje da li je povećanje u propustljivosti jona posledica fizičkog oštećenja stratum corneum-a. Metoda ispitivanja TER koja koristi kožu pacova ukazuje na *in vivo* korozivnost na kunićima koja se procenjuje u metodi ispitivanja V.4. koja je data u ovom prilogu**2**. *In vivo* ispitivanje na kunićima je visoko konzervativan u pogledu na korozivnost i iritabilnost za kožu u poređenju sa "patch" testom na humanoj koži**15**.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Životinje**

Koriste se pacovi jer je osetljivost njihove kože na hemikalije u ovoj metodi prethodno prikazana**10**. Starost (u trenutku uzimanja kože) i soj pacova su veoma važni kako bi se obezbedilo da su folikuli dlake u fazi mirovanja pre nego što počne rast krzna odraslih.

Dlaka na leđima i boku mladih, približno 22 dana starih mužjaka ili ženki pacova (izvedenih od Wistar ili sličnog soja) pažljivo se ukloni pomoću malih makaza. Onda se životinje peru pažljivim brisanjem, dok se ograničeni deo potapa u rastvor antibiotika (koji sadrži, npr. streptomicin, penicilin, hloramfenikol i amfotericin, u koncentracijama koje imaju efekat inhibicije rasta bakterija). Životinje se peru antibioticima ponovo trećeg i četvrtog dana posle prvog pranja i koriste se tokom tri dana posle drugog pranja, kada se stratum corneum oporavio od odstranjivanja dlake.

**1.5.2. Priprema diskova kože**

Životinje se humano lišavaju života kada su 28 do 30 dana stari. Ovo doba je kritično. Dorzalno-lateralna koža svake životinje ukloni se i skine se prekomerna subkutana masnoća pažljivim guljenjem sa kože. Diskovi kože prečnika od oko 20 mm se uklone. Koža se može čuvati pre nego što se diskovi upotrebe kada je pokazano da su podaci pozitivne i negativne kontrole jednaki onima koji se dobiju sa svežom kožom.

Svaki disk kože se postavlja preko jednog od krajeva politetrafluoroetilenske (u daljem tekstu: PTFE) cevi, obezbeđujući da je epidermalna površina u kontaktu sa cevi. Gumeni "O" prsten stavlja se na kraj cevi kako bi držao kožu na mestu i višak tkiva se odstranjuje. Dimenzije cevi i "O" prstena prikazane su na Slici 2. Gumeni "O" prsten se tada pažljivo pečati za kraj PTFE cevi vazelinom. Cev se podupire opružnom podloškom unutar receptorske komore koja sadrži rastvor magnezijum sulfata (154 mM) (Slika 1). Disk kože je potpuno uronjen u rastvor MgSO4. Čak 10 do 15 diskova kože može se dobiti od jedne kože pacova.

Pre nego što počne ispitivanje, meri se električni otpor dva diska kože kao postupak kontrole kvaliteta za svaku kožu životinje. Oba diska daju vrednost otpora veću od 10 kΩ kako bi se preostali diskovi koristili u ispitivanju. Ukoliko je vrednost otpora manja od 10 kΩ, preostali diskovi te kože se odbacuju.

**1.5.3. Primena ispitivanih i kontrolnih supstanci**

Tečne ispitivane supstance (150 μL) ravnomerno se nanose na epidermalnu površinu unutar cevi. Prilikom ispitivanja čvrstih materijala, nanosi se dovoljna količina čvrste materije ujednačeno na disk tako da čitava površina epidermisa bude pokrivena. Preko čvrste materije dodaje se dejonizovana voda (150 μL) i cev se blago prodrma. Kako bi se postigao maksimalan kontakt s kožom, čvrste materije je možda potrebno zagrejati do temperature od 30° C da bi se otopile ili je potrebno omekšati ispitivanu supstancu ili je usitniti da se napravi zrnasti materijal ili prah.

Tri diska kože koriste se za svaku ispitivanu i kontrolnu supstancu. Ispitivane supstance se primenjuju 24 sata pri temperaturi od 20° C do 23° C. Ispitivana supstanca se uklanja pranjem pod mlazom vode temperature do 30° C sve dok se više supstance ne može odstraniti.

**1.5.4. TER merenja**

Impedanca kože se meri tako što se meri TER niskovoltažnim uređajem s naizmeničnom strujom Wheatstone databridge**13**. Opšte karakteristike mosta su radni napon 1-3 Volt-a, naizmenična struja od 50 Hz do 1.000 Hz sinusnog ili četvrtastog oblika i opseg merenja od najmanje 0,1 kΩ do 30 kΩ. "Databridge" koji je korišćen u studiji validacije gde je merio induktivnost, kapacitivnost i otpor do vrednosti od redom 2.000 H, 2.000 μF i 2 MΩ, pri frekvencijama od 100 Hz ili 1 kHz koristeći redne ili paralelne vrednosti. U svrhu TER korozivnosti, merenja u ispitivanju se snimaju u otporu, pri frekvenci od 100 Hz i korišćenjem rednih vrednosti. Pre merenja električnog otpora površinski napon kože se smanjuje dodavanjem dovoljne zapremine 70% etanola da pokrije epiderm. Posle nekoliko sekundi etanol se uklanja iz cevi i tkivo se tada hidrira dodavanjem rastvora 3 mL rastvora magnezijum sulfata (154 mM). "Databridge" elektrode se postavljaju na obe strane diskova kože kako bi se izmerio otpor u kΩ/disk kože (Slika 1). Dimenzije elektroda i dužina elektroda koja je izložena ispod štipaljki prikazane su na Slici 2. Štipaljka koja je zakačena na unutrašnju elektrodu otvorena je na vrhu PTFE cevi tokom merenja otpora kako bi se obezbedilo da je dužina elektrode koja je uronjena u rastvor MgSO4 stalna. Spoljna elektroda se nalazi unutar receptorske komore tako da naleže na dno komore. Razmak između opružne podloške i dna PTFE cevi održava se konstantnim (Slika 2), budući da ovaj razmak utiče na dobijene vrednosti otpora. Zbog toga, razmak između unutrašnje elektrode i diska kože treba da bude konstantan i minimalan (1 mm do 2 mm).

Ukoliko je izmerena vrednost otpora veća od 20kΩ, to može biti zbog toga što ostaci ispitivane supstance prekrivaju epidermalnu površinu diska kože. Može se pokušati sa daljim odstranjivanjem ovog sloja, npr. začepljivanjem PTFE cevi palcem u rukavici i protresanjem približno 10 sekundi. Rastvor magnezijum sulfata se odstranjuje i merenje otpora se ponavlja sa svežim magnezijum sulfatom.

Svojstva i dimenzije aparature za ispitivanje i postupka ispitivanja koji se koriste mogu da utiču na dobijene vrednosti TER. Granična vrednost od 5 kΩ je izvedena iz podataka dobijenih sa specifičnom aparaturom i postupkom koji su opisani u ovoj metodi. Drugačija granična vrednost i vrednosti kontrole mogu se primeniti ukoliko su uslovi ispitivanja izmenjeni ili se koristi drugačija aparatura. Zbog toga je neophodno kalibrisati ovu metodologiju i vrednosti graničnog otpora ispitivanjem serije referentnih standarda koji su izabrani od hemikalija korićenih u studiji validacije**4, 5** ili od hemijskih klasa sličnih hemikaliji koja se ispituje. Grupa odgovarajućih referentnih hemikalija data je u Tabeli 1.

**1.5.5. Metode vezivanja boje**

Ekspozicija određenim materijalima koji nisu korozivni može da ima za posledicu smanjenje otpora ispod granice od 5 kΩ dozvoljavajući prolazak jona kroz stratum corneum tako smanjujući električni otpor**5**. Na primer, neutralne organske i hemikalije koje imaju površinski aktivna svojstva (uključujući detergente, emulgatore i druge surfaktante) mogu da uklone lipide kože čineći barijeru više propustljivom za jone. Ako su TER vrednosti ispitivane supstance manje od ili približno 5 kΩ u odsustvu vidljivog oštećenja, procena prodiranja boje izvodi se na kontrolnim i tretiranim tkivima da bi se odredilo da li su dobijene TER vrednosti rezultat povećane propustljivosti kože ili korozivno oštećenje kože**3, 5**. U drugom slučaju kada postoji prekid u stratum corneum-u, boja sulforodamin B, kada se nanese na površinu kože brzo prodire i boji potporno tkivo. Ova određena boja je stabilna prema širokom opsegu hemikalija i na rezultate ne utiče proces ekstrakcije koji je opisan ispod.

*1.5.5.1. Nanošenje i uklanjanje sulforodamin B boje*

Posle procene TER, magnezijum sulfat se odstranjuje iz cevi i koža se pažljivo pregleda kako bi se uočilo oštećenje. Ukoliko nema vidljivog većeg oštećenja, boja sulforodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS broj 222-529-8; CAS broj 3520-42-1), 150 µL 10% (w/v) rastvor u destilovanoj vodi nanosi se na epidermalnu površinu svakog diska kože na dva sata. Diskovi kože se tada ispiraju sa vodom sa česme pri najviše sobnoj temperaturi približno 10 sekundi kako bi se odstranila sva prekomerna/nevezana boja. Svaki disk kože pažljivo se ukloni sa PTFE cevi i stavlja u bočicu (npr. 20 mL staklena scintilaciona bočica) koja sadrži dejonizovanu vodu (8 mL). Bočice se lagano mešaju pet minuta kako bi se odstranila dodatna nevezana boja. Ovaj postupak ispiranja se zatim ponavlja, posle čega se diskovi kože uklanjaju i stavljaju u bočice koje sadrže 5mL 30% (w/v) natrijum dodecilsulfata (SDS) u destilovanoj vodi i inkubiraju se preko noći na 60° C.

Posle inkubacije svaki disk kože se odstranjuje i baca, a preostali rastvor se centrifugira osam minuta pri 21° C (relativna centrifugalna sila je oko 175xg). Uzorak od 1mL supernatanta se razblažuje 1 u 5 (v/v) (tj. 1mL + 4mL) sa 30% (w/v) SDS u destilovanoj vodi. Optička gustina (u daljem tekstu: OD) rastvora meri se na 565 nm.

*1.5.5.2. Izračunavanje sadržaja boje*

Sadržaj boje sulforodamin B po disku izračunava se iz OD vrednosti**5** (koeficijent molarne estinkcije boje sulforodamin B pri 565 nm = 8,7 x 104; molekularna masa = 580). Sadržaj boje sulforodamin B određuje se za svaki disk kože korišćenjem odgovarajuće kalibracione krive i zatim se izračunava srednja vrednost sadržaja boje za replikate.

**2. PODACI**

Vrednosti otpora (kΩ) i srednje vrednosti sadržaja boje(μg/disk), kada to odgovara, za ispitivani materijal, kao i za pozitivne i negativne kontrole navode se tabelarno (pojedinačni podaci ispitivanja i srednje vrednosti ± S.D.), uključujući podatke za ponovljene eksperimente, srednje vrednosti i pojedinačne vrednosti.

*2.1. TUMAČENJE REZULTATA*

Srednje vrednosti TER prihvataju se ako su vrednosti istovremene pozitivne i negativne kontrole u prihvatljivim okvirima za metodu u laboratoriji koja vrši ispitivanje. Prihvatljivi opsezi otpora za metodologiju i aparaturu koje su opisane dati su u sledećoj tabeli:

Tabela 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| kontrola | supstanca | opseg otpora (kΩ) |
| pozitivna | 10M hlorovodonična kiselina | 0,5 - 1,0 |
| negativna | destilovana voda | 10 - 25 |

Rezultati srednje vrednosti sadržaja boje prihvataju se ako se vrednosti istovremene kontrole nalaze u okviru prihvatljivih opsega za metodu. Predloženi prihvatljivi opsezi sadržaja boje za kontrolne supstance za metodologiju i aparaturu koje su opisani su:

Tabela 2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| kontrola | supstanca | opseg sadržaja boje (μg/disk) |
| pozitivna | 10M hlorovodonična kiselina | 40 - 100 |
| negativna | destilovana voda | 15 - 35 |

Supstanca koja se ispituje ne smatra se korozivnom za kožu:

a) ako je srednja vrednost TER dobijena za ispitivanu supstancu veća od 5 kΩ ili

b) ako je srednja vrednost TER manja ili jednaka 5 kΩ i

- disk kože ne pokazuje vidljivo oštećenje i

- srednja vrednost sadržaja boje diska je daleko ispod srednjeg sadržaja boje diska istovremene pozitivne kontrole, 10M HCl.

Ispitivana supstanca se smatra korozivnom za kožu:

a) ako je srednja vrednost TER manja ili jednaka 5 kΩ i disk kože je vidljivo oštećen ili

b) ako je srednja vrednost TER manja ili jednaka 5 kΩ i

- disk kože ne pokazuje vidljivo oštećenje, ali

- srednja vrednost sadržaja boje diska je veća ili jednaka srednjoj vrednosti sadržaja boje diska istovremene pozitivne kontrole, 10M HCl.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanim i kontrolnim supstancama:

- hemijsko ime kao što je IUPAC ili CAS ime i CAS broj, ako je poznato;

- čistoća i sastav supstance ili smeše (u težinskim procentima) i fizička priroda;

- fizička i hemijska svojstva kao što su fizičko stanje, pH, stabilnost, rastvorljivost u vodi, ono što je relevantno za izvođenje studije;

- tretman ispitivane/kontrolne supstance pre ispitivanja, ako je primenljivo (npr. zagrevanje, usitnjavanje);

- stabilnost, ako je poznata.

2) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćen soj i pol;

- starost životinja u trenutku kada se koriste kao donorske životinje;

- izvor, uslovi smeštaja, ishrana, itd.;

- detalji pripremanja kože.

3) Uslovima ispitivanja:

- kalibracione krive za aparaturu na kojoj se vrši ispitivanje;

- kalibracione krive za izvođenje ispitivanja vezivanja boje;

- detalji postupka ispitivanja koji se koristi za merenja TER;

- detalji postupka ispitivanja koji se koristi za procenu vezivanja boje, ako odgovara;

- opis svake izmene postupka ispitivanja;

- opis korišćenih kriterijuma za ocenjivanje.

4) Rezultatima:

- u tabeli dati podaci ispitivanja TER i vezivanja boje (ako je odgovarajuće) za svaku pojedinačnu životinju i uzorak kože;

- opis svakog primećenog efekta.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. OECD, (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, p. 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology. *In vitro* 12, p. 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.- G., and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology. *In vitro* 12, p. 483- 524.

6. OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129-147.

8. ICCVAM, (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

9. ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis\_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat‘s Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C., (1986) An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J., (1992) The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. Toxic. *In vitro* 6, p. 191-194.

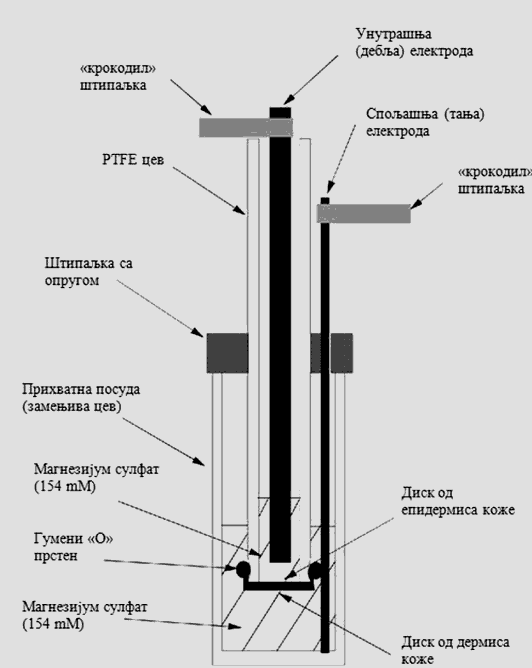
14. Worth A.P., Fentem J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720

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

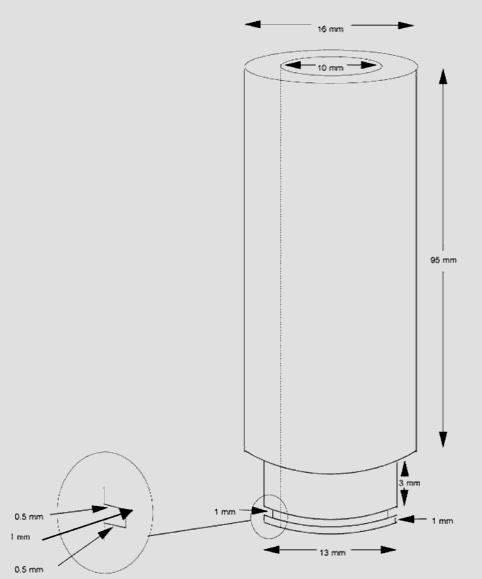
16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C., (1988) An *In vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxicology *In vitro*. 2, p. 7-17.

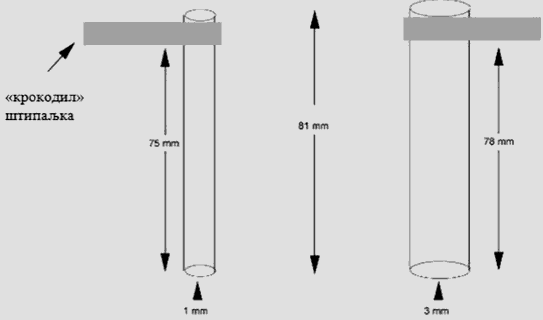
Slika 1

Aparatura za ispitivanje kože pacova TEP ogledom



Slika 2. Dimenzije politetrafluoroetilenske (PFTE) i receptorske cevi i elektroda koje se koriste





Kritični faktori aparature koja je prikazana:

- unutrašnji promer PTFE cevi;

- dužina elektrode u odnosu na PTFE cev i receptorsku cev, tako da elektroda ne dotiče disk kože i da je standardna dužina elektrode u kontaktu sa rastvorom magnezijum sulfata;

- količina rastvora magnezijum sulfata u receptorskoj cevi daje dubinu tečnosti, u odnosu na nivo u PTFE cev, kao što je prikazano na Slici 1;

- disk kože je dovoljno dobro pričvršćen za PTFE cev, tako da električni otpor bude prava mera svojstava kože.

**B.40. BIS. *IN VITRO* KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE: ISPITIVANJE NA MODELU HUMANE KOŽE**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 431 (2004).

*1.1. UVOD*

Korozivno oštećenje kože odnosi se na stvaranje ireverzibilnog oštećenja tkiva u koži po nanošenju materijala koji se ispituje (kao što je definisano u GHS)**1**. Ova metoda ispitivanja ne zahteva upotrebu živih životinja ili životinjskog tkiva za procenu korozivnosti za kožu.

Procena korozivnosti za kožu uključuje upotrebu laboratorijskih životinja**2**. Zabrinutost zbog bola i patnje životinja koje su uključene u ovaj postupak pominje se u reviziji metode B.4. koja je data u ovom prilogu i koja dozvoljava određivanje korozivnog oštećenja kože upotrebom alternativnih, *in vitro* metoda, da bi se izbegli bol i patnja životinja.

Prvi korak ka definisanju alternativnih ispitivanja koji se mogu koristiti za ispitivanje korozivnosti za kožu u regulatorne svrhe bilo je izvođenje prevalidacionih studija**3**. Potom je izvedena**6, 7, 8** formalna validacija studija *in vitro* metoda za procenu korozivnost oštećenja kože**4, 5**. Ishod ovih studija i druga objavljena literatura**9** doveli su do preporuke da se sledeća ispitivanja mogu koristiti za procenu *in vivo* korozivnosti za kožu**10, 11, 12, 13**: ispitivanje sa modelom humane kože (ova metoda) i ispitivanje transkutanog električnog otpora (videti metodu B.40. koja je data u ovom prilogu).

Studije validacije potvrđuju da je ispitivanjima a koji uključuju modele humane kože**3, 4, 5, 9** moguće pouzdano napraviti razliku između poznatih korozivnih i nekorozivnih supstanci za kožu. Postupak ispitivanja može da obezbedi naznaku razlike između jakih i manje jakih koroziva za kožu.

Ispitivanje koje se opisuje u ovoj metodi omogućava identifikaciju korozivnih hemijskih supstanci i smeša. To dalje omogućava identifikaciju supstanci i smeša koje nisu korozivne kada je to potkrepljeno određivanjem težine dokaza korišćenjem (na osnovu) postojećih podataka (npr. pH, odnos struktura - aktivnost, humani i/ili životinjski podaci)**1, 2, 13, 14**. To obično ne daje odgovarajuće podatke o iritaciji kože, niti dozvoljava subklasifikaciju korozivne supstance kao što je to dozvoljeno u GHS**1**.

Za potpunu procenu lokalnih efekata na koži posle jednokratnog izlaganja putem kože, preporučuje se da se prati sledeća strategija ispitivanja kao što je dato u metodi ispitivanja B.4. koja je data u ovom prilogu**2** i kao što je dato u GHS**1**. Ova strategija ispitivanja uključuje izvođenje *in vitro* ispitivanja za korozivno oštećenje kože (kao što je opisano u ovoj metodi) i iritacije kože pre razmatranja ispitivanja na živim životinjama.

*1.2. DEFINICIJE*

Korozivno oštećenje *in vivo* jeste nastanak ireverzibilnih oštećenja kože odnosno vidljive nekroze u epidermisu i dermisu nakon četvoročasovne primene ispitivane supstance. Korozivno oštećenje kože karakteriše se prema tipu izazvanog oštećenja kao:ulkus, krvarenje ili krvave kraste i na kraju perioda posmatranja od 14 dana prema promeni boje kože uslovljene perutanjem i pojavi površina sa alopecijom i ožiljnog tkiva. U cilju procene nejasnih oštećenja obavljaju se histopatološka ispitivanja.

Vijabilnost ćelija jeste parametar koji meri ukupnu aktivnost ćelijske populacije (npr. sposobnost ćelijske mitohondrijalne dehidrogenaze da smanji vitalnu boju MTT), koja, u zavisnosti od ciljnog pokazatelja ispitivanja koji se meri i korišćenog dizajna ispitivanja korelira sa ukupnim brojem i/ili vitalnosti ćelija.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Tabela 1: Referentne hemikalije

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Naziv | EINECS broj | CAS broj |  |
| 1,2-diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | jako korozivno |
| akrilna kiselina | 201-177-9 | 79-10-7 | jako korozivno |
| 2-terc-butilfenol | 201-807-2 | 88-18-6 | korozivno |
| kalijum-hidroksid (10%) | 215-181-3 | 1310-58-3 | korozivno |
| sumporna kiselina (10%) | 231-639-5 | 7664-93-9 | korozivno |
| oktanska kiselina (kaprilna kiselina) | 204-677-5 | 124-07-02 | korozivno |
| 4-amino-1,2,4-triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | nije korozivno |
| eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | nije korozivno |
| fenetil-bromid | 203-130-8 | 103-63-9 | nije korozivno |
| tetrahloroetilen | 204-825-9 | 27-18-4 | nije korozivno |
| izostearinska kiselina | 250-178-0 | 30399-84-9 | nije korozivno |
| 4-(metiltio)-benzaldehid | 222-365-7 | 3446-89-7 | nije korozivno |

Većina navedenih hemikalija preuzeto je sa spiska hemikalija izabranih za međunarodnu studiju validacije ECVAM**4**. Njihov izbor se bazira na sledećim kriterijumima:

a) jednak broj korozivnih i nekorozivnih supstanci;

b) komercijalno dostupne supstance koje pokrivaju većinu relevantnih hemijskih klasa;

v) obuhvatanje jako korozivnih kao i manje korozivnih supstanci kako bi se omogućilo razlikovanje na osnovu korozivnog potencijala;

g) izbor hemikalija kojima se može rukovati u laboratoriji bez postavljanja drugih ozbiljnih opasnosti osim korozivnosti.

*1.4. PRINCIP METODE*

Ispitivani materijal nanosi se površinski na trodimenzionalni model ljudske kože, koji se sastoji najmanje od rekonstruisanog epidermisa sa funkcionalnim stratum corneum-om. Korozivni materijali se identifikuju po njihovoj sposobnosti da izazovu smanjenje vijabilnosti ćelija (kao što je određeno npr. korišćenjem eseja smanjenja MTT**15**) ispod definisanih granica pri određenim periodima izlaganja. Princip ispitivanja modela humane kože zasniva se na hipotezi da korozivne hemikalije mogu da prodru kroz stratum corneum difuzijom ili erozijom i dovoljno su citotoksične da uzrokuju odumiranje potpornih slojeva ćelija.

**1.4.1. Postupak**

*1.4.1.1. Modeli ljudske kože*

Modeli ljudske kože mogu biti sastavljeni ili dobijeni komercijalno (npr. modeli EpiDermTM and EPISKINTM)**16, 17, 18, 19** ili mogu biti razvijeni ili sastavljeni u laboratoriji koja vrši ispitivanje**20, 21**. Upotreba humane kože je predmet domaćih i međunarodnih etičkih razmatranja i uslova. Svaki novi model se validira (najmanje u obimu koji je opisan u odeljku 1.4.1.1.2. ove metode). Modeli humane kože koji se koriste za ovo ispitivanje zadovoljavaju sledeće:

1.4.1.1.1. Opšti uslovi za model

Humani keratinociti se koriste za izradu epitelijuma. Ispod funkcionalnog stratum corneum-a prisutno je više slojeva vijabilnih epitelijalnih ćelija. Model kože može da ima sloj sa stromalnom komponentom. Stratum corneum je višeslojan sa neophodnim lipidnim profilom da stvara funkcionalnu barijeru sa snagom da pruži otpor brzom prodiranju citotoksičnih markera. Svojstva sastava modela sprečavaju prolazak materijala oko stratum corneum-a do vijabilnog tkiva. Prolazak ispitivanih hemikalija oko stratum corneum-a dovodi do lošeg modelovanja ekspozicije kože. Model kože je bez kontaminacije bakterijama (uključujući mikoplazmu) ili gljivicama.

*1.4.1.1.2. Uslovi za funkcionalni model*

Veličina vijabilnosti obično se kvantifikuje upotrebom MTT ili druge vitalne boje koja se metabolički transformiše. U ovim slučajevima optička gustina (u daljem tekstu: OD) ekstrahovane (rastvorene) boje iz negativnog kontrolnog tkiva je najmanje 20 puta veća od OD samog ekstrakcionog rastvarača (za opšti pregled videti literaturu**22**). Negativno kontrolno tkivo je stabilno u kulturi (obezbeđujući slična merenja vijabilnosti) u trajanju perioda ispitivanog izlaganja. Stratum corneum je dovoljno otporan da se odupre brzom prodiranju određenih hemikalija - citotoksičnih markera (tj. 1% Triton X-100). Ovo svojstvo može da bude procenjeno vremenom ekspozicije koje je potrebno da se smanji vijabilnost ćelija za 50% (ET50) (npr. za modele EpiDermTM and EPISKINTM ono je > 2 sata). Ovo tkivo prikazuje reproduktivnost tokom vremena i najbolje između laboratorija. Sem toga, ono treba da može da predvidi korozivni potencijal referentne hemikalije (videti Tabelu 1) kada se koristi u izabranom protokolu ispitivanja.

*1.4.1.2. Primena ispitivanih i kontrolnih supstanci*

Dva replikata (kopije) tkiva koriste se za svaki tretman (vreme izlaganja), uključujući kontrole. Za tečne materijale, dovoljno ispitivane supstance se nanosi tako da ujednačeno prekrije površinu kože: koristi se najmanje 25 μL/cm2. Za čvrste materijale, dovoljno ispitivane supstance se nanosi ujednačeno da pokrije kožu i navlaži se sa dejonizovanom ili destilovanom vodom kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Kada je prikladno, čvrste supstance se usitne u prah pre primene. Metoda primene treba da bude odgovarajuća za ispitivanu supstancu (videti literaturu**5**). Na kraju perioda izlaganja, ispitivani materijal se pažljivo pere sa površine kože sa odgovarajućom puferom ili 0,9% NaCl.

Istovremene pozitivne i negativne kontrole se koriste za svaku studiju kako bi se obezbedila adekvatna performansa eksperimentalnog modela. Predložene supstance za pozitivnu kontrolu su glacijalna sirćetna kiselina ili 8N KOH. Predložene negativne kontrole su 0,9% NaCl ili voda.

*1.4.1.3. Merenja vijabilnosti ćelija*

Samo kvantitativne, validovane metode mogu se koristiti za merenje vijabilnosti ćelija. Mera vijabilnosti mora da bude kompatibilna sa upotrebom trodimenzionalne konstrukcije tkiva. Nespecifično vezivanje boje ne sme da interferira sa merenjem vijabiliteta. Boje koje se vezuju za protein i one koje ne podležu metaboličkoj tranformaciji (npr. neutral red) zato nisu pogodne. Najčešće korišćeno ispitivanje je smanjenje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, Tiazol plavo: EINECS broj 206-069-5, CAS broj 298-93-1)), za koji je pokazano da daje tačne i reproduktivne rezultate**5**, ali mogu se koristiti i druga ispitivanja. Uzorak kože se stavlja u rastvor MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3 - 1mg/mL) na odgovarajućoj inkubacionoj temperaturi tokom tri sata. Istaloženi plavi proizvod formazan se zatim ekstrahuje upotrebom rastvarača (izopropanola) i meri se koncentracija formazana se meri određivanjem OD na talasnoj dužini između 540 nm i 595 nm.

Hemijsko dejstvo ispitivanog materijala na vitalnu boju može da liči na metabolizam ćelije vodeći do pogrešne procene vijabilnosti. Ovo se dešava kada takav ispitivani materijal nije potpuno uklonjen sa kože ispiranjem**9**. Ako ispitivani materijal direktno deluje na vitalnu boju, dodatne kontrole se koriste kako bi se detektovala i korigovala interferencija ispitivane supstance sa merenjem vijabiliteta**9, 23**.

**2. PODACI**

Za svako tkivo navode se OD vrednosti i izračunati procenti vijabilnosti ćelija za svaki ispitivani materijal, pozitivne i negativne kontrole, uključujući podatke od replikata ponovljenih eksperimenata kako odgovara, srednje i pojedinačne vrednosti.

*2.1. TUMAČENJE REZULTATA*

Dobijene OD vrednosti za svaki ispitivani uzorak mogu se koristiti za izračunavanje procenta vijabiliteta u odnosu na negativnu kontrolu, koja je 100%. Granična vrednost procenta vijabiliteta koja pravi razliku između korozivnih i nekorozivnih materijala (ili razliku između različitih klasa koroziva) ili statistička procedura koja se koristi da se ocene rezultati i identifikuju korozivni materijali, jasno se definišu, dokumentuju i prikazuju da su odgovarajući. Ove granične vrednosti utvrđuju se za vreme optimizacije ispitivanja, ispituju se tokom prevalidacione faze i potvrđuju u validacionoj studiji. Kao primer predviđanje korozivnosti koja je u vezi sa modelom EpiDermTM je**9**:

Ispitivana supstanca se smatra korozivnom za kožu:

a) ako je vijabilnost posle tri minuta izlaganja manja od 50% ili

b) ako je vijabilnost posle tri minuta izlaganja veća ili jednaka 50% i vijabilnost posle jednog sata izloženosti manja od 15%.

Ispitivana supstanca se ne smatra korozivnom za kožu:

a) ako je vijabilnost posle tri minuta izloženosti veća ili jednaka 50% i vijabilnost posle 1 sata izlaganja veća ili jednaka 15%.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Ispitivanim i kontrolnim supstancama:

- hemijsko ime kao što je IUPAC ili CAS ime i CAS broj, ako je poznato;

- čistoća i sastav supstance ili smeše (u težinskim procentima);

- fizička i hemijska svojstva kao što su fizičko stanje, pH, stabilnost, rastvorljivost u vodi, ono što je relevantno za izvođenje studije;

- tretman ispitivane/kontrolne supstance pre ispitivanja, ako je primenljivo (npr. zagrevanje, usitnjavanje);

- stabilnost, ako je poznata.

2) Opravdanju modela kože i korišćenog postupka.

3) Uslovima ispitivanja:

- korišćen sistem ćelija;

- podatke o kalibraciji za uređaj za merenje koji se koristi za merenje vijabilnosti ćelija (npr. spektrofotometar);

- svi podaci na koje se oslanjalo za specifični model kože uključujući njegovu validaciju;

- detalji postupka ispitivanja;

- korišćene doze;

- opis modifikacije postupka ispitivanja;

- reference prema istorijskim podacima za model;

- opis korišćenih kriterijuma za ocenjivanje.

4) Rezultatima:

- podaci pojedinačnih ispitivanih uzoraka u tabeli;

- opis drugih primećenih efekata.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, p. 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology *In vitro* 12, p. 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

6. OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G., (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, p. 371-401.

10. ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, p. 275-280.

11. ECVAM, (2000) ECVAM News & Views. ATLA 28, p. 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis\_brd.pdf.

13. OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat‘s Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

15. Mosmann, T., (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, p. 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxicology *In vitro* 8, p. 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterisation of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, p. 211-225.

18. Tinois, E., Gaetani, Q., Gayraud, B., Dupont, D., Rougier, A., Pouradier, D.X., (1994) The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach, p. 133-140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). *In vitro* and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193, p. 310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H., (1992) The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, p. 163-171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L., (1994) Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, p. 747-756.

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, p. 69-84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne’, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A., (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 15, p. 57-93.

**B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU ISPITIVANJE FOTOTOKSIČNOSTI**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 432 (2004).

*1.1. UVOD*

Fototoksičnost se definiše kao toksična reakcija na supstancu primenjenu na organizam koja je ili izazvana ili pojačana (jasna pri nižim doznim nivoima) posle naknadnog izlaganja svetlosti ili koja je uzrokovana zračenjem kože posle sistemske primene supstance.

*In vitro* 3T3 NRU ispitivanje fototoksičnosti se koristi za identifikovanje fototoksičnog potencijala ispitivane supstance koji je izazvan pobuđenom hemikalijom posle ekspozicije svetlu. Ispitivanje ocenjuje foto-citotoksičnost relativnim smanjenjem u vijabilnosti ćelija koje su izložene hemikaliji u prisustvu svetlosti u odnosu na odsustvo svetlosti. Supstance koje su identifikovane ovim ispitivanjem su verovatno fototoksične *in vivo* po sistemskoj primeni i distribuciji u kožu ili posle površinske primene (lokalne primene na kožu).

Mnoge vrste hemikalija su prijavljene da izazivaju fototoksične efekte**1, 2, 3, 4**. Njihovo zajedničko svojstvo je njihova sposobnost da apsorbuju svetlosnu energiju u opsegu sunčeve svetlosti. Prema prvom zakonu fotohemije (zakon Grotthaus-Draper), fotoreakcija zahteva dovoljnu apsorpciju kvantuma svetlosti. Zbog toga, pre razmatranja biološkog ispitivanja, određuje se UV/vis apsorpcioni spektar ispitivane supstanceXIV. Predloženo je da ako je molarni ekstinkcioni/apsorpcioni koeficijent manji od 10 litre x mol-1 x cm-1 onda supstanca verovatno nije fotoreaktivna. Takvu hemikaliju nije neophodno ispitivati *in vitro* 3T3 NRU ispitivanjem fototoksičnosti ili bilo kojim drugim ispitivanjem za štetne fotohemijske efekte**1, 5**. Videti Deo drugi ove metode.

Pouzdanost i relevantnost *in vitro* 3T3 NRU ispitivanja fototoksičnosti je nedavno evaluirana**6, 7, 8, 9**. *In vitro* 3T3 NRU test fototoksičnosti se pokazao predvidivim za akutne fototoksične efekte kod životinja i ljudi *in vivo*. Test nije dizajniran da predvidi druge štetne efekte koji bi se mogli pojaviti iz kombinovanog dejstva hemikalije i svetlosti, npr. ne odnosi se na fotogenotoksičnost, fotoalergiju ili fotokarcinogenost, niti dozvoljava procenu potencijala fototoksičnosti. Test nije dizajniran da se odnosi na indirektne mehanizme fototoksičnosti, efekte metabolita ispitivane supstance ili efekte smeša.

Kako je upotreba metabolišućih sistema opšti zahtev za sve *in vitro* testove za predviđanje genotoksičnosti i karcinogenog potencijala, do sada, u slučaju fototoksikologije, postoje samo retki primeri kada je potrebna metabolička transformacija za hemikaliju da bi se ponašala kao fotootrov *in vivo* ili *in vitro*. Zbog toga se ne smatra neophodnim niti naučno opravdanim za ovaj test da se izvodi sa sistemom metaboličke aktivacije.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XIV** Prema OECD TG 101

*1.2. DEFINICIJE*

Zračenje jeste intenzitet upadnog ultravioletnog (u daljem tekstu: UV) ili vidljivog svetla na površini, meren u W/m2 ili mW/cm2.

Doza svetlosti jeste količina (koja je jednaka proizvodu intenziteta i vremena) UV ili vidljivog upadnog zračenja na površini, izražen u džulima (= W × s) po jedinci površine, npr. J/m2 ili J/cm2.

Talasne dužine UV svetlosti jesu oznake koje je preporučila CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), i to su: UVA (315 nm do 400 nm), UVB (280 nm do 315 nm) i UVC (100 nm do 280 nm). Druge oznake su takođe u upotrebi: podela između UVB i UVA se često stavlja na 320 nm, a UVA može biti podeljena u UV-A1 i UV-A2 s podelom napravljenom na oko 340 nm

Viabilitet ćelija jeste parametar koji meri ukupnu aktivnost ćelijske populacije (npr. upijanje vitalne boje Neutral Red u ćelijske lizozome), koja u zavisnosti od ciljnog pokazatelja ispitivanja koji se meri i korišćenog dizajna ispitivanja korelira sa ukupnim brojem i/ili vitalnosti ćelija

Relativni viabilitet ćelija jeste ćelijski viabilitet izražen u odnosu na negativne (rastvarač) kontrole koje su prošle celi eksperimentalni postupak (+Irr ili -Irr), ali nisu tretirane sa ispitivanom hemikalijom.

Fotoiritaciioni faktor (u daljem tekstu: PIF) jeste faktor izveden upoređivanjem dve podjednako efikasne citotoksične koncentracije (IC50) ispitivane hemikalije dobijene u odsustvu (-Irr) i u prisustvu (+Irr) necitotoksičnog zračenja sa UVA/vis svetlošću.

IC50 jeste koncentracija ispitivane hemikalije koja smanjuje viabilnost ćelija za 50%.

Srednji fotoefekat (u daljem tekstu: MPE) jeste mera izvedena iz matematičke analize krivih koncentracija odgovor dobijenih u odsustvu (-Irr) i u prisustvu (+Irr) zračenja sa UVA/vis svetlošću koje nije cititiksično.

Fototoksičnost jeste akutna toksična reakcija koja je izazvana posle prvog izlaganja kože određenim hemikalijama i naknadnom izlaganju svetlu ili koja je slično izazvana zračenjem kože posle sistemske primene hemikalije.

*1.3. PRINCIP METODE*

*In vitro* 3T3 NRU test fototoksičnosti zasnovan je na poređenju citotoksičnosti hemikalije, kada se ispituje u prisustvu i odsustvu izlaganja necitotoksičnoj dozi simulirane sunčeve svetlosti. Citotoksičnost je u ovom testu izražena kao smanjenje preuzimanja vitalne boje, Neutral Red. Zavisno od koncentracije, kada se meri 24 sata posle tretmana ispitivanom hemikalijom i zračenja**10**. NR je slaba katjonska boja koja lako prodire kroz membrane ćelija ne-difuzijom, akumulirajući se intracelularno u lizosomima. Promene u površini osetljive lizosomalne membrane vodi do lizosomalne nepostojanosti i drugih promena koje postepeno postaju ireverzibilne. Takve promene koje su nastale dejstvom ksenobiotika imaju za posledicu smanjenje preuzimanja i vezivanja NR. Na ovaj način se može napraviti razlika između viabilnih, oštećenih ili mrtvih ćelija, što je osnova ovog ispitivanja.

Balb/c 3T3 ćelije se održavaju u kulturi 24 sata da bi se formirali monoslojevi. Dve posude sa 96 bazenčića po ispitivanoj hemikaliji se pre-inkubiraju sa osam različitih koncentracija ispitivane supstance u trajanju od 1 sata. Potom se jedna od dve posude izlaže najvišoj dozi ne-citotoksičnog zračenja dok se druga posuda drži u mraku. Zatim se u obe posude medijum tretmana zameni medijumom za kultivisanje i posle sledećih 24 sata inkubacije određuje se viabilitet ćelija preuzimanjem Neutral Red boje. Viabilitet ćelija se izražava kao procenat od netretiranih kontrola rastvarača i računa se za svaku ispitivanu koncentraciju. Kako bi se predvideo potencijal fototoksičnosti, porede se koncentracione reakcije dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja, obično pri nivou IC50, tj. pri koncentraciji koja smanjuje viabilitet ćelija do 50% u poređenju sa netretiranim kontrolama.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Pripreme**

*1.4.1.1. Ćelije*

Permanentna ćelijska linija mišjih firoblasta, Balb/c 3T3, klon 31, bilo iz Kolekcije kultura američkog tipa (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, USA ili iz Evropske Kolekcije ćelijskih kultura (The European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) korišćena je u studiji validacije i zato se preporučuje da se nabave iz dobro kvalifikovanih depoa ćelija. Uz isti postupak ispitivanja mogu se koristiti druge ćelije ili ćelijske linije ako su uslovi kultivisanja prilagođeni specifičnim potrebama ćelija, ali se pokazuje ekvivalentnost.

Ćelije se redovno proveravaju na odsustvo kontaminacije mikoplazmom i koristiti jedino ako nijedna mikoplazma nije pronađena**11**.

Važno je da se redovno proverava osetljivost ćelija na UV prema postupcima kontrole kvaliteta koje su opisane u ovoj metodi. Zbog toga što se UVA osetljivost ćelija može povećati s brojem prolaza, koristi se Balb/c 3T3 ćelije najnižeg broja prolaza koji se može dobiti, najbolje manje od 100 (videti odeljak 1.4.2.2.2. ove metode i Deo treći ove metode).

*1.4.1.2. Medijum i uslovi kultivisanja*

Odgovarajući medijum za kultivisanje i uslovi kultivacije se koriste za rutinske prolaze ćelija i tokom postupka ispitivanja, npr. za ćelije Balb/c 3T3 oni su DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kome je dodato 10% seruma novorođenog govečeta, 4 mM glutamina, penicilin (100 IU) i streptomicin (100 μg/mL), i vlažna inkubacija na 37° C, 5%-7,5% CO2 u zavisnosti od pufera (videti odeljak 1.4.1.4. drugi pasus ove metode). Naročito je važno da uslovi kultivisanja ćelija obezbede da vreme ciklusa ćelija bude u okviru normalnog istorijskog opsega ćelija ili ćelijskih linija koje se koriste.

*1.4.1.3. Pripremanje kultura*

Ćelije iz zamrznutih "stock" kultura zaseju se u medijum za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini i subkultivišu najmanje jednom pre upotrebe u *in vitro* 3T3 NRU testu fototoksičnosti.

Ćelije koje se koriste za test fototoksičnosti poseju se u medijum za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini tako da kulture ne dostignu nagomilavanje do kraja testa, tj. kada je viabilitet ćelija određen 48 sati posle zasejavanja ćelija. Za ćelije Balb/c 3T3 koje rastu u posudama od 96 bazenčića, preporučena gustina zasejavanja ćelija je 1 × 104 ćelija po bazenčiću.

Za svaku ispitivanu supstancu ćelije se zaseju identično u dve odvojene posude sa 96 bazenčića, koji zatim istovremeno prolaze postupak ispitivanja pod identičnim uslovima kultivacije osim za vremenski period kada se jedna posuda izlaže zračenju (+Irr) a druga se drži u mraku (-Irr).

*1.4.1.4. Priprema ispitivane supstance*

Ispitivane supstance se pripremaju sveže, odmah pre upotrebe osim ukoliko podaci pokazuju njihovu stabilnost pri čuvanju. Preporučuje se da se celokupna priprema hemikalija i inicijalni tretman ćelija izvede pod svetlosnim uslovima koji bi izbegli fotoaktivaciju ili degradaciju ispitivane supstance ispitivane supstance pre zračenja.

Ispitivane hemikalije se rastvore u puferovanim rastvorima soli, npr. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) ili drugom fiziološki izbalansiranom puferskom rastvoru koji ne sadrži proteinske sastojke, sastojke koji apsorbuju svetlost (npr. pH-idikatorke boje ili vitamini) kako bi se izbegla interferencija tokom zračenja. Kako se tokom zračenja ćelije drže oko 50 minuta van CO2 inkubatora, vodi se računa da se izbegne alkalizacija. Ako se koriste slabi puferi kao EBSS, ovo se može postići inkubiranjem ćelija pri 7,5% CO2. Ako se ćelije inkubiraju pri samo 5% CO2, bira se jači pufer.

Ispitivane hemikalije ograničene rastvorljivosti u vodi rastvaraju se u odgovarajućem rastvaraču. Ako se koristi rastvarač, on je prisutan u konstantnoj zapremini u svim kulturama, tj. u negativnoj kontroli (kontroli rastvarača) kao i u svim koncentracijama ispitivane supstance i da ne bude toksičan pri tim koncentracijama. Koncentracije ispitivane supstance biraju se tako da se izbegne taloženje ili mutnoća rastvora.

Preporučeni rastvarači su dimetilsulfoksid (u daljem tekstu: DMSO) i etanol (u daljem tekstu: ETOH). Mogu odgovarati i drugi rastvori niske citotoksičnosti. Pre upotrebe procenjuju se svi rastvarači prema specifičnim svojstvima, npr. reakcija sa ispitivanom supstancom, gušenje fototoksičnog efekta, svojstva dejonizacije radikala i/ili hemijska stabilnost u rastvaraču.

Mešanje na vorteksu i/ili zagrevanje do odgovarajućih temperatura može da se koristi kako bi se pomoglo rastvaranje ukoliko ovo ne bi imalo uticaja na stabilnost ispitivane supstance.

*1.4.1.5. Uslovi zračenja*

1.4.1.5.1. Izvor svetlosti

Izbor odgovarajućeg izvora svetlosti i filtera je kritičan faktor u ispitivanju fototoksičnosti. Svetlost UVA i vidljive oblasti obično se dovodi u vezu sa fototoksičnim odgovorima *in vivo***3, 12**, dok je generalno UVB od manjeg značaja ali je visoko citotoksična. Citotoksičnost se povećava 1.000 puta kako talasna dužina ide od 313 nm do 280 nm**13**. Kriterijumi za izbor odgovarajućeg izvora svetlosti uključuju zahtev da svetlosni izvor emituje talasne dužine koje apsorbuje ispitivana supstanca (apsorpsioni spektar) i da doza svetlosti (koja se može postići u razumnom vremenu izlaganja) bude dovoljna za detekciju poznatih fotocitotoksičnih hemikalija. Talasne dužine i doze koje se koriste ne treba da prekomerno štete ispitivanom sistemu, npr. oslobađanje toplote (infracrvena oblast).

Simulacija sunčeve svetlosti sa solarnim simulatorima smatra se optimalnim veštačkim izvorom svetlosti. Raspodela snage zračenja filtriranog solarnog simulatora je približna dnevnoj svetlosti spoljašnjeg prostora koja je data u literaturi**14**. Ksenonski luk i (dopirani) živa-metal halogeni luk se koriste kao solarni simulatori**15**. Druga ima prednost emitovanja manje toplote i što je jeftinija slaganje sa sunčevom svetlošću je manje idealna u poređenju sa ksenonskim lukovima. Zbog toga što svi solarni simulatori emituju značajne količine UVB one se odgovarajuće filtriraju da bi se prigušile UVB talasne dužine visoke citotoksičnosti. Zbog toga što plastični materijali za kultivisanje ćelija sadrže UV stabilizatore spektar se meri kroz isti tip poklopca posude sa 96 bazenčića kao onaj koji će se koristiti u testu. Nezavisno od mera preduzetih da bi se prigušili delovi spektra filtriranjem ili neizbežnim filterskim efektima opreme, spektar zabeležen ispod ovih filtera ne treba da odstupa od standardizovane spoljašnje dnevne svetlosti**14**. Primer distribucije spekralnog zračenja filtriranog solarnog simulatora korišćenog u studiji validacije *in vitro* 3T3 NRU testa fototoksičnosti je dat u literaturi**8, 16**. Videti Deo treći Slika 1. ove metode.

1.4.1.5.2. Doziranje

Intenzitet svetlosti (zračenja) se redovno proverava pre svakog testa fototoskičnosti koristeći odgovarajući UV-metar širokog opsega. Intenzitet se meri preko istog tipa poklopca posude sa 96 bazenčića kao što će se koristiti u testu. UV-metar je kalibrisan prema izvoru. Proveravaju se karakteristike UV-metra i u ovu svrhu preporučuje se upotreba drugog, referentnog UV-metra iste vrste i ista kalibracija. Idealno, pri većim intervalima koristi se spektroradiometar za merenje spektralnog zračenja filtriranog izvora svetlosti i proveriti kalibraciju UV-metra širokog opsega.

Doza od 5 J/cm2 (kao što je merena u UVA opsegu) je određena da ne bude citotoksična za ćelije Balb/c 3T3 i dovoljno jaka da pobudi hemikalije da izazovu fototoksičnu reakciju**6, 7** npr. da postigne 5 J/cm2 tokom vremenskog perioda od 50 minuta zračenje je bilo podešeno na 1,7 mW/cm2. Videti Deo treći Slika 2. ove metode. Ukoliko se koristi druga ćelijska linija ili drugi svetlosni izvor, doza zračenja možda treba da se kalibriše tako da način doziranja može da bude izabran da nije štetan za ćelije ali da je dovoljan da pobudi standardne fotootrove. Vreme izlaganja svetlosti se računa na sledeći način:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *t*(min) = | doza zračenja (*J*/cm2)x100 |  |
| zračenje (*mW* / cm2)x60 |  |

(1 *J* = *1 Wsec*)

**1.4.2. Eksperimentalni uslovi**

*1.4.2.1. Koncentracije ispitivane supstance*

Opsezi koncentracija ispitivane hemikalije u prisustvu (+Irr) ili u odsustvu (-Irr) svetlosti adekvatno se određuju u eksperimentima koji su osmišljeni za nalaženje opsega. Bilo bi korisno prvo proceniti rastvorljivost i na 60 minuta (ili koje vreme će se koristiti) jer rastvorljivost može da se promeni tokom vremena ili za vreme trajanja ekspozicije. Da bi se izbegla toksičnost koja je uzrokovana neodgovarajućim uslovima kultivisanja ili visokom kiselošću ili alkalnosti hemikalije, pH ćelijskih kultura sa dodatom ispitivanom supstancom je u opsegu 6,5 do 7,8.

Najviša koncentracija ispitivane supstance je u okviru fizioloških uslova ispitivanja, npr. izbegava se osmotski ili pH stres. U zavisnosti od ispitivane hemikalije, možda je neophodno razmotriti druga fizikohemijska svojstva kao ograničavajuće faktore za najvišu ispitivanu koncentraciju. Za relativno nerastvorne supstance koje nisu toksične pri koncentracijama do tačke zasićenja ispituje se najviša koncentracija koja se može postići.

Izbegava se taloženje ispitivane hemikalije pri bilo kojoj ispitivanoj koncentraciji. Maksimalna koncentracija ispitivane supstance ne prelazi 1.000 μg/mL; osmolalnost ne prelazi 10 mmolar. Koristi se serija geometrijskoh razblaženja osam koncentracija ispitivane supstance sa konstantnim faktorom razblaženja (videti odeljak 2.1. drugi pasus ove metode).

Ukoliko postoje podaci (iz eksperimenta nalaženja opsega) da ispitivana supstanca nije citotoksična do granice koncentracije u eksperimentu u mraku (-Irr), ali je visoko toksična kada je ozračena (+Irr), opseg koncentracija koji se bira za (+Irr) eksperiment može da se razlikuje od onog izabranog za (−Irr) eksperiment da bi ispunio zahtev adekvatnosti kvaliteta podataka.

*1.4.2.2. Kontrole*

1.4.2.2.1. Osetljivost ćelija na zračenje, uspostavljanje istorijskih podataka

Ćelije se redovno proveravaju (približno svakog petog prolaza) na osetljivost prema izvoru svetlosti procenom njihove viabilnosti po ekspoziciji rastućim dozama zračenja. U ovoj proceni se koristi nekoliko doza zračenja, uključujući nivoe značajno veće od onih koji se koriste u 3T3 NRU testu fototoksičnosti. Ove doze se najlakše kvantifikuju merenjima UV delova izvora svetlosti. Ćelije se zasade pri gustini koja se koristi u *in vitro* 3T3 NRU testu fototoksičnosti i zrače se sledećeg dana. Onda se određuje viabilitet ćelija dan kasnije korišćenjem preuzimanja Neutral Red boje. Pokazuje se da je nastala najveća necitotoksična doza (npr. u studiji validacije: 5 J/cm2 (UVA)) bila dovoljna da ispravno klasifikuje referentnu hemikaliju (Tabela 1).

1.4.2.2.2. Osetljivost na zračenje, provera tekućeg testa

Ispitivanje zadovoljava kriterijume kvaliteta ako ozračene negativne kontrole/kontrole rastvarača pokažu viabilitet veći od 80% u poređenju sa neozračenom negativnom kontrolom/kontrolom rastvarača.

1.4.2.2.3. Sposobnost rasta kontrola rastvarača

Apsolutna optička gustina (OD540 NRU) boje Neutral Red ekstrahovane iz kontrole rastvarača ukazuje na to da li je 1×104 ćelija koje su zasejane po bazenčiću pokazalo rast sa normalnim vremenom udvostručavanja tokom dva dana testa. Ispitivanje zadovoljava kriterijume prihvatanja ako je srednja vrednost OD540 NRU netretiranih kontrola ≥ 0,4 (tj. približno 20 puta veća od podloge apsorbancije rastvarača).

1.4.2.2.4. Pozitivna kontrola

Poznata fototoksična hemikalija se testira istovremeno sa svakim *in vitro* 3T3 NRU testom fototoksičnosti. Preporučuje se hlorpromazin (u daljem tekstu: CPZ). Za CPZ koji se testira sa standardnim postupkom u *in vitro* 3T3 NRU testu fototoksičnosti, određeni su kriterijumi za prihvatanje testa: ozračen CPZ (+Irr): IC50=0,1 do 2,0μg/ml, neozračen CPZ (-Irr): IC50 = 7,0 do 90,0 μg/mL. Foto iritacioni faktor (Photo Irritation Factor, PIF) je > 6. Prate se istorijske karakteristike pozitivne kontrole.

Mogu da se koriste druge fototoksične hemikalije, koje odgovaraju za hemijsku klasu ili karakteristike rastvorljivosti hemikalije koja se procenjuje, kao istovremena pozitivna kontrola umesto hlorpromazina.

**1.4.3. Postupak ispitivanja6, 7, 8, 16, 17**

*1.4.3.1. Prvi dan*

Razdeliti 100 μL medijuma za kultivisanje u periferne bazenčiće posude sa 96 bazenčića za mikrotitraciju tkivnih kultura (= slepe probe). U preostale bazenčiće, razdeliti 100 μL suspenzije ćelija od 1×105 ćelija/mL u medijumu za kultivisanje (= 1×104 ćelija/bazenčić). Dve posude se pripremaju za svaku seriju pojedinačnih koncentracija ispitivane supstance i za kontrolu rastvarača i konpozitivnu kontrolu.

Inkubirati ćelije 24 sata (videti odeljak 1.4.1.2. ove metode) dok ne formiraju polukonfluentan monosloj. Ovaj period inkubacije dozvoljava oporavak ćelija, adherenciju i eksponencijalni rast.

*1.4.3.2. Drugi dan*

Posle inkubacije dekantovati medijum kulture od ćelija i isprati pažljivo sa 150 μL puferovanog rastvora koji je korišćen za inkubaciju. Dodati 100 μL pufera koji sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivane supstance ili rastvarača (kontrola rastvarača). Primeniti osam različitih koncentracija ispitivane hemikalije. Inkubatori ćelije sa ispitivanom supstancom u mraku 60 minuta (videti odeljak 1.4.1.2. i odeljak 1.4.1.4. drugi pasus ove metode).

Od dve posude pripremljene za svaku seriju koncentracija ispitivane supstance i kontrola, jedna se izabere, obično nasumično, za određivanje citotoksičnosti (-Irr) (t.j. kontrolna posuda) i jedna (tretirana posuda) za određivanje fototoksičnosti (+Irr).

Za izvođenje +Irr ekspozicije, ozračiti ćelije na sobnoj temperaturi 50 minuta preko poklopca posudice sa 96 bazenčića sa najvišom dozom zračenja koja nije citotoksična (videti Deo treći ove metode). Držati neozračene posude (-Irr) na sobnoj temperaturi u mračnoj kutiji 50 minuta (= vreme izlaganja svetlosti).

Dekantovati ispitivani rastvor i pažljivo isprati dva puta sa 150 μL puferskog rastvora koji je korišćen za inkubaciju, ali koji ne sadrži ispitivani materijal. Zameniti pufer sa medijumom za kultivaciju i inkubirati (videti odeljak 1.4.1.2. ove metode) preko noći (18 sati do 22 sata).

*1.4.3.3. Treći dan*

1.4.3.3.1. Mikroskopska procena

Ćelije se pregledaju na rast, morfologiju i integritet monosloja koristeći fazno kontrasni mikroskop. Beleže se promene u morfologiji ćelija i efekti na ćelijski rast.

1.4.3.3.2. Test preuzimanja boje Neutral Red

Isprati ćelije sa 150 μL prethodno zagrejanog pufera. Ukloniti rastvor za ispiranje nežnim lupkanjem. Dodati 100 μL rastvora Neutral Red (u daljem tekstu: NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidrohlorid, EINECS broj 209-035-8; CAS broj 553-24-2; C.I. 50040) koncentracije 50 μg/mL u medijum bez seruma**16** i inkubirati kao što je opisano u odeljku 1.4.1.2. ove metode tokom tri sata. Posle inkubacije, ukloniti NR medijum i isprati ćelije sa 150 μL pufera. Dekantovati i ukloniti višak pufera upijanjem ili centrifugiranjem.

Dodati tačno 150 μL rastvora za odstranjivanje NR (sveže pripremljen 49 delova vode + 50 delova etanola + 1 deo sirćetne kiseline).

Mešati posudu za mikrotitraciju nežno na mešalici 10 minuta dok se NR ne ekstrahuje iz ćelija i formira homogeni rastvor.

Izmeriti optičku gustinu ekstrakta NR na 540 nm na spektrofotometru prema slepoj probi. Sačuvati podatke u dokumentu odgovarajućeg elektronskog formata za dalju analizu.

**2. PODACI**

*2.1. KVALITET I KVANTITET PODATAKA*

Podaci ispitivanja omogućavaju značajnu analizu koncentracije - odgovora dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja i, ako je moguće, koncentraciju ispitivane hemikalije pri kojoj je viabilnost ćelija smanjena na 50% (IC50). Ukoliko se pronađe citotoksičnost i opseg koncentracija i odsečak pojedinačnih koncentracija se postavljaju tako da omoguće podešavanje krive prema eksperimentalnim podacima.

Za jasno pozitivne i za jasno negativne rezultate (vedeti odeljak 2.3. prvi pasus ove metode), može da bude dovoljan primarni eksperiment koji je podržan jednim ili sa više preliminarnih ispitivanja nalaženja opsega.

Dvosmisleni, granični ili nejasni rezultati se razjašnjavaju daljim ispitivanjima (videti odeljak 2.4. drugi pasus ove metode). U takvim slučajevima razmatra se izmena eksperimentalnih uslova. Eksperimentalni uslovi koji se mogu izmeniti uključuju opseg koncentracija ili razmak između koncentracija, vreme pre-inkubacije i vreme izlaganja zračenju. Kraće vreme izlaganja može da bude pogodno za hemikalije nestabilne u vodi.

*2.2. PROCENA REZULTATA*

Da bi se omogućila ocena rezultata, može se računati foto-iritacioni faktor (Photo-Irritation-Factor, PIF) ili srednji foto-efekat (Mean Photo Effect, MPE).

Za izračunavanje mera fototoksičnosti (videti ispod) potrebno je aproksimovati skup pojedinačnih vrednosti koncentracija - odgovor pomoću odgovarajuće neprekidne (model) krive koncentracija - odgovor. Podešavanje krive prema podacima obično se izvodi ne-linearnom regresivnom metodom**18**. Da bi se procenio uticaj varijabilnosti podataka na podešavanje krive, preporučuje se postupak bootstrap.

Foto-iritacioni faktor (u daljem tekstu: PIF) izračunava se upotrebom formule:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PIF = | IC50(-Irr) |  |
| IC50(+Irr) |  |

Ako se IC50 u prisustvu i u odsustvu svetlosti ne može izračunati, PIF se ne može odrediti za ispitivani materijal. Srednji foto-efekat (u daljem tekstu: MPE) određuje se na osnovu upoređivanja završenih koncentracija - odgovor krivih.

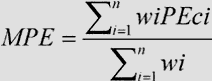


Foto-efekat PEc pri bilo kojoj koncentraciji C se definiše kao proizvod odgovora efekta REc i doze efekta DEc tj. PEc = REc × DEc. Odgovor efekta REc je razlika između odgovora primećenog u odsustvu i u prisustvu svetlosti, tj. REc = Rc (-Irr) − Rc (+Irr). Doza-efekat se daje kao:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DEc = | C/C \* - 1 |  |
| C/C \* +1 |  |

Pri čemu C\* jeste ravnotežna koncentracija, odnosno koncentracija pri kojoj je +Irr odgovor jednak -Irr odgovoru pri koncentraciji C. Ako se C\* ne može odrediti zato što su vrednosti odgovora +Irr krive sistematski više ili niže nego RC(-Irr), dozni efekat je 1. Faktori wi su dati po najvišoj vrednosti odgovora, tj. wi = MAX {Ri (+Irr), Ri (-Irr)}. Koncentracija Ci se bira tako da isti broj tačaka pripadne svakom koncentracionom intervalu koji su definisani sa vrednosti koncentracije pri kojoj najmanje jedna ili dve krive i dalje pokazuju vrednost odgovora od najmanje 10%. Ako je ova maksimalna koncentracija viša od najviše koncentracije koja je korišćena u +Irr eksperimentu, onda se rezidualni deo +Irr krive podešava da je vrednost odgovora "0". U zavisnosti od toga da li je MPE vrednost veća od određene cut-off vrednosti (MPEc = 0,15) ili nije, hemikalija se klasifikuje kao fototoksična.

Softverski paket za izračunavanje PIF i MPE je dostupan**20**.

*2.3. TUMAČENJE REZULTATA*

Na osnovu studije validacije**8**, ispitivana supstanca sa PIF < 2 ili sa MPE < 0,1 predviđa: "nije fototoksično". Ako je PIF > 2 i < 5 ili ako je MPE > 0,1 i < 0,15 predviđa: "verovatna fototoskičnost"; i ako je PIF > 5 ili MPE > 0,15 predviđa: "fototoksičnost".

Za laboratorije koje uvode ovaj test, ispituju se referentni materijali nabrojani u Tabeli 1. pre ispitivanja ispitivane supstance za procenu fototoksičnosti. Vrednosti PIF i MPE su približne vrednostima pomenutim u Tabeli 1.

Tabela 1.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Hemijski naziv | EINECS broj | CAS broj | PIF | MPE | Apsorpcioni maksimum | Rastvarač**XV** (1) |
| amiodaron HCL | 243-293-2 | [19774-82-4] | > 3,25 | 0,2-0,54 | 242 nm 300 nm | etanol |
| hlorpromazin HCL | 200-701-3 | [69-09-0] | > 14,4 | 0,33-0,63 | 309 nm | etanol |
| norfloksacin | 274-614-4 | [70458-96-7] | > 71,6 | 0,34-0,90 | 316 nm | acetonitril |
| antracen | 204-371-1 | [120-12-7] | > 18,5 | 0,19-0,81 | 356 nm | acetonitril |
| Protoporfirin **IX**, dinatrijum | 256-815-9 | [50865-01-5] | > 45,3 | 0,54-0,74 | 402 nm | etanol |
| L-histidin |  | [7006-35-1] |  | 0,05-0,10 | 211 nm | voda |
| heksahlorofen | 200-733-8 | [70-30-4] | 1,1-1,7 | 0,00-0,05 | 299 nm 317 nm | etanol |
| Natrijum-lauril sulfat | 205-788-1 | [151-21-3] | 1,0-1,9 | 0,00-0,05 | Nema apsorpcije | voda |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XV** Rastvarač koji se koristi za merenje apsorbancije.

*2.4. TUMAČENJE REZULTATA*

Fototoksični efekti se uočavaju samo pri najvišim ispitivanim koncentracijama (naročito za ispitivane hemikalije koje su rastvorne u vodi). Dodatna razmatranja mogu biti neophodna za procenu hazarda. Ovo može uključiti podatke o apsorpciji kože i o akumulaciji hemikalije u koži i/ili podatke iz drugih testova, npr. ispitivanje hemikalije na *in vitro* životinjskoj ili ljudskoj koži ili modelima kože.

Ako nije pokazana toksičnost (+Irr i -Irr) i ako je slaba rastvorljivost bila ograničavajući faktor za koncentracije koje mogu biti ispitane, može se dovesti u pitanje kompatibilnost ispitivane supstance sa testom i razmatra se potvrdno testiranje upotrebom npr. drugog modela.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- podaci o identifikaciji, uobičajeni generički nazivi i IUPAC i CAS brojevi, ako su poznati;

- fizička priroda i čistoća;

- fizička i hemijska svojstva relevantna za izvođenje studije;

- UV/vis apsorpcioni spektar;

- stabilnost i fotostabilnost, ako je poznata.

2) Rastvaraču:

- opravdanje za izbor rastvarača;

- rastvorljivost ispitivane hemikalije u rastvaraču;

- procenat prisustva rastvarača u medijumu za tretman.

3) Ćelijama:

- vrsta i izvor ćelija;

- odsustvo mikoplazme;

- broj ćelijskih prolaza, ako je poznat;

- osetljivost ćelija na zračenje, određena opremom za zračenje koja se koristi u *in vitro* 3T3 NRU testu fototoksičnosti.

4) Uslovima ispitivanja**1**; inkubaciji pre i posle tretmana:

- vrsta i sastav medijuma za kultivisanje;

- uslovi inkubacije (koncentracija CO2; temperatura; vlažnost);

- trajanje inkubacije (predtretman, post-tretman).

5) Uslovima ispitivanja**2**; tretmanu hemikalijom:

- osnova za izbor koncentracija ispitivane hemikalije koje su korišćene u prisustvu i u odsustvu zračenja;

- u slučaju ograničene rastvorljivosti ispitivane hemikalije i odsustva citotoksičnosti: osnova za najvišu ispitivanu koncentraciju;

- vrsta sastava medijuma za tretiranje (puferovani rastvor soli);

- trajanje hemijskih tretmana.

6) Uslovima ispitivanja**3**; zračenju:

- osnova za izbor izvora svetlosti koji je korišćen;

- proizvođač i vrsta izvora svetlosti i radiometra;

- karakteristike spektralnog zračenja izvora svetlosti;

- transmisione i apsorpcione karakteristike korišćenih filtera;

- karakteristike radiometra i pojedinosti o kalibraciji;

- razmak svetlosnog izvora od ispitivanog sistema;

- UVA zračenje pri ovom razmaku, izraženo u mW/cm2;

- trajanje izlaganja UV/vis svetlosti;

- UVA doza (zračenje × vreme), izražena u J/cm2;

- temperatura ćelijskih kultura tokom zračenja i ćelijskih kultura koje se istovremeno drže u mraku.

7) Uslovima ispitivanja**4**; Neutral Red testu viabilnosti:

- sastav Neutral Red medijuma za tretiranje;

- trajanje inkubacije sa Neutral Red;

- uslovi inkubacije (koncentracija CO2; temperatura; vlažnost);

- uslovi ekstrakcije Neutral Red (ekstrakcija; trajanje);

- talasna dužina koja je korišćena za spektrofotometrijsko čitanje optičke gustine Neutral Red;

- druga talasna dužina (referentna), ako je korišćena;

- sadržaj slepe probe spektrofotometra, ako je korišćena.

8) Rezultatima:

- viabilnost ćelija dobijena iz svake koncentracije ispitivane hemikalije, izražena u procentu viabilnosti od srednje vrednosti istovremene kontrole rastvarača;

- krive koncentracija - odgovor (koncentracija ispitivane supstance prema relativnoj viabilnosti ćelija) dobijene u istovremenim +Irr i -Irr ispitivanjima;

- analiza krivih koncentracija - odgovor: ako je moguće, izračunavanje IC50 (+Irr) i IC50 (-Irr);

- upoređivanje dve krive koncentracija - odgovor dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja, bilo računanjem foto-iritacionog faktora (PIF), bilo računanjem srednjeg foto-efekta (MPE);

- kriterijumi za prihvatanje testa; istovremena kontrola rastvarača;

- apsolutna viabilnost (optička gustina ekstrakta Neutral Red) ozračenih i neozračenih ćelija;

- istorijski podaci negativne i kontrole rastvarača; srednje vrednosti i standardne devijacije;

- kriterijumi za prihvatanje testa; istovremena pozitivna kontrola;

- IC50(+Irr) i IC50(-Irr) i PIF/MPE hemikalije koja je korišćena kao pozitivna kontrola;

- istorijski podaci o hemikaliji koja je korišćena kao pozitivna kontrola: IC50(+Irr) i IC50(-Irr) i PIF/MPE; srednje vrednosti i standardne devijacije.

9) Obrazloženju rezultata.

10) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Lovell W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology *In vitro* 7, p. 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G., (1972) List of the photodynamic substances. In ‘Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry’ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p. XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

4. Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In 'The science of Photobiology' Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

5. OECD, (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 7 'Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water' Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In vitro* 8, p. 793-796.

7. Anon, (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology *In vitro* 12, p. 305-327.

9. OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat‘s Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, p. 119-124.

11. Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A., (1996) Animal models for phototoxicity testing. In ‘Dermatotoxicology’, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M., (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, p. 1825-1829.

14. ISO 10977., (1993) Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. p. 18.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U., (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679-708.

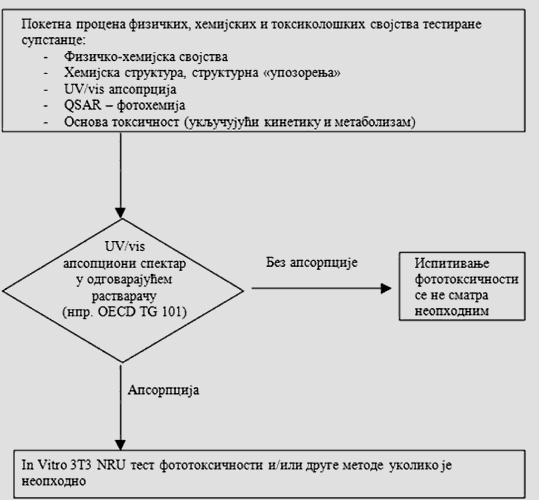
18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

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

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\_2649\_34377\_2349687\_1\_1\_1\_1,00.html

**Deo drugi**

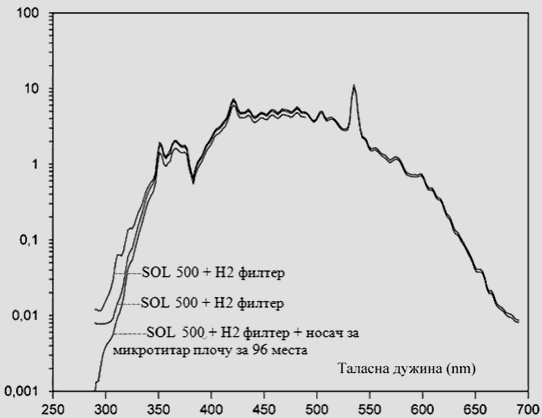
**ULOGA 3T3 NRU PT U PRISTUPU KORAK PO KORAK ZA ISPITIVANJE FOTOTOKSIČNOSTI HEMIKALIJA**



**Deo treći**

Slika 1: Raspodela spektralne moći filtriranog solarnog simulatora

Zračenje (mV/cm2)

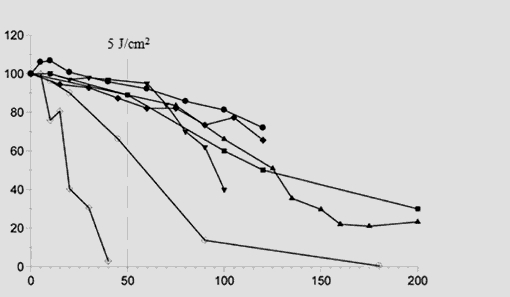


(Videti odeljak 1.4.1.5. drugi pasus ove metode)

Slika 1. daje primer prihvatljive raspodele spektralnog zračenja filtriranog solarnog simulatora. On je od punjenog metal halofenog izvora koji je korišćen u probi validacije 3T3 NRU PT**6, 8, 17**. Prikazani su efekat dva različita filtera i dodatni efekat filtriranja poklopca posude sa 96 bazenčića. Filter H2 je korišćen samo sa test sistemima koji mogu da tolerišu veću količinu UVB (test modela kože i test foto-hemolize eritrocita). U 3T3 NRU PT korišćen je H1 filter. Slika pokazuje da je dodatni efekat filtriranja poklopca posude uglavnom uočen u opsegu UVB, ali i dalje ostavljajući dovoljno UVB spektar zračenja da se pobude hemikalije koje tipično apsorbuju UVB opseg, kao što je amjodaron (videti Tabelu 1).

Slika 2: Osetljivost na zračenje Balb/c 3T3 ćelija (izmereno u opsegu UVA)

Viabilnost ćelija (% preuzimanja Neutral Red od strane kontrola u mraku)



Vreme ozračivanja (minuti)  
10 min= 1 joule UVA/cm2

(Videti odeljak 1.4.1.5.2. drugi pasus i odeljke 1.4.2.2.1. i 1.4.2.2.2. ove metode)

Osetljivost Balb/c 3T3 ćelija na zračenje sa solarnim simulatorom koji je korišćen u probi validacije 3T3 NRU testa fototoksičnosti, merena u UVA opsegu. Slika pokazuje rezultate dobijene u sedam različitih laboratorija u prevalidacionoj studiji**1**. Zbog toga što su obe krive sa otvorenim znakovima dobijene sa ostarelim ćelijama (veliki broj prolaza), one su morale da budu zamenjene novim sa zadebljanim oznakama koje pokazuju prihvatljivu toleranciju na zračenje, koje su dobijene na novim ćelijama. Iz ovih podataka izvedena je najviša doza zračenja koja nije toksična, od 5 J/cm2. Horizontalna isprekidana linija dodatno pokazuje maksimalno prihvatljiv efekat zračenja dat u odeljku 1.4.2.2. ove metode.

**B.42. SENZIBILIZACIJA KOŽE: TEST LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova eksperimentalna metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 429 (2002).

*1.1. UVOD*

Test lokalnih limfnih čvorova (Local Lymph Node Assay, u daljem tekstu: LLNA) je u dovoljnoj meri proveren i prihvaćen da se opravda njegovo prihvatanje kao nove metode**1, 2, 3**. Ovo je druga metoda za ocenjivanje potencijala hemikalije da izazove senzibilizaciju kože kod životinja. Druga metoda (Metoda V.6. koja je data u ovom prilogu) koristi zamorce, pre svega test maksimizacije i Buehlerov test**4**.

LLNA daje alternativnu metodu za identifikaciju hemikalija koje izazivaju senzibilizaciju kože i za potvrđivanje da hemikalije nemaju značajan potencijal da uzrokuju senzibilizaciju kože. Ovo ne znači da se LLNA uvek koristi umesto ispitivanja na zamorcima, već pre da je ovaj test jednako dobar i da može biti primenjen kao alternativa u kojoj pozitivni i negativni rezultati uglavnom ne zahtevaju dalju potvrdu.

LLNA pruža određene prednosti u odnosu na naučni napredak i dobrobit životinja. Test proučava fazu indukcije senzibilizacije kože i daje kvantitativne podatke pogodne za procenu odnosa doza-odgovor. Detalji validacije LLNA i pregled rada u vezi s tim su objavljeni**5, 6, 7, 8**. Blagi/umereni senzibilizatori koji su preporučeni kao pogodne supstance za pozitivnu kontrolu za testove na zamorcima takođe su pogodni za korišćenje u LLNA**6, 8, 9**.

LLNA je *in vivo* metoda i ne eliminiše korišćenje životinja u ocenjivanju aktivnosti kontaktne senzibilizacije. Ona ima potencijal da smanji broj životinja koji je potreban za ovu svrhu. LLNA nudi značajno poboljšanje u načinu na koji se životinje koriste za testiranje kontaktne senzibilizacije. LLNA se zasniva na razmatranju imunoloških pojava koje su stimulisane hemikalijama za vreme indukcione faze senzibilizacije. Za razliku od ispitivanja na zamorcima, LLNA ne zahteva primenu osporavanih dermalnih reakcija preosetljivosti. Ova metoda ne zahteva korišćenje adjuvansa, kao što je slučaj kod testa maksimizacije na zamorcima. Zbog toga LLNA smanjuje stres kod životinja. Uprkos prednostima ove metode u odnosu na tradicionalne testove na zamorcima, postoje određena ograničenja koja mogu zahtevati tradicionalna ispitivanja na zamorcima (npr. lažno negativni rezultati LLNA sa nekim metalima, lažno pozitivni rezultati sa nekim iritansima kože)**10**.

Videti Opšti uvod.

*1.2. PRINCIP METODE*

Osnovni princip u LLNA je da senzibilišuće supstance dovode do primarne proliferacije limfocita u limfnom čvoru koji drenira mesto primene hemikalije. Ova proliferacija je proporcionalna primenjenoj dozi (i potenciji alergena) i predstavlja jednostavno sredstvo za dobijanje objektivne, kvantitativne mere senzibilizacije. LLNA procenjuje ovu proliferaciju kao odnos doza-odgovor u kojem se proliferacija u ispitivanim grupama upoređuje sa onom kod kontrola tretiranih rastvaračem. Odnos proliferacije u tretiranim grupama prema onima u kontrolama rastvarača, nazvana "indeks stimulacije", određuje se i mora da bude najmanje tri, pre nego što se ispitivana supstanca dalje ocenjuje kao potencijalno senzibilišuća za kožu. Ovde opisane metode zasnivaju se na korišćenju radioaktivnog obeležavanja kako bi se izmerila proliferacija ćelija. Drugi pokazatelji ispitivanja za ocenjivanje proliferacije mogu se primeniti ukoliko postoji opravdanje i odgovarajuća naučna podrška, uključujući potpune navode i opis metodologije.

*1.3. OPIS METODE*

**1.3.1. Pripreme**

*1.3.1.1. Uslovi smeštaja i ishrane*

Životinje se smeštaju pojedinačno. Temperatura prostorije za eksperimentalne životinje je 22° C (±3° C). Relativna vlažnost je najmanje 30% i ne prelazi 70% osim za vreme čišćenja prostorija. Ciljna vlažnost je 50% do 60%. Svetlo je veštačko sa sekvencama od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Može da se koristi konvencionalna laboratorijska ishrana uz slobodan pristup vodi za piće.

*1.3.1.2. Priprema životinja*

Životinje se biraju nasumce i označavaju da bi se omogućila identifikacija jedinki (ali ne označavanjem ušiju na bilo koji način) i drže se u kavezima najmanje pet dana pre početka doziranja kako bi se aklimatizovale na laboratorijske uslove. Pre početka tretmana sve životinje se pregledaju da se utvrdi da nemaju vidljivih lezija na koži.

**1.3.2. Uslovi ispitivanja**

*1.3.2.1. Eksperimentalne životinje*

Za ovaj test koristi se miš. Ispitivanje se izvodi na mladim odraslim ženkama miševa soja CBA/Ca ili CBA/J, koje nisu ranije rađale i nisu gravidne. Na početku studije životinje treba da budu između 8 i 12 nedelja stare i varijacija u telesnoj masi životinja treba da bude minimalna i ne sme da prelazi 20% prosečne telesne mase. Drugi sojevi i mužjaci mogu se koristiti kada se prikupi dovoljno podataka da se pokaže da ne postoje značajne razlike u LLNA odgovoru između određenih sojeva i/ili polova.

*1.3.2.2. Provera pouzdanosti*

Pozitivne kontrole se koriste kako bi se pokazala odgovarajuća svojstva testa i kompetentnost laboratorije da uspešno obavi studiju. Pozitivna kontrola dovodi do pozitivnog LLNA odgovora pri nivou ekspozicije za koji se očekuje da povećanje indeksa stimulacije (SI) > 3 u odnosu na negativnu kontrolnu grupu. Doza pozitivne kontrole bira se tako da indukcija bude jasna ali ne prekomerna. Poželjno je primeniti supstance: heksil cinamin aldehid (CAS broj 101-86-0, EINECS broj 202-983-3) i merkaptobenzotiazol (CAS broj 149-30-4, EINECS broj 205-736-8). Mogu postojati okolnosti u kojima se, uz dovoljno opravdanje, mogu koristiti druge kontrolne supstance koje zadovoljavaju gore navedene kriterijume. Grupa pozitivne kontrole može biti potrebna u svakom testu, mogu postojati situacije u kojima će laboratorije imati istorijske podatke pozitivne kontrole koji pokazuju konzistentnost zadovoljavajućeg efekta tokom šestomesečnog ili dužeg perioda. U tim slučajevima može biti pogodno ređe testiranje s pozitivnim kontrolama u periodima kraćim od 6 meseci. Mada se pozitivna kontrolna supstanca ispituje u vehikulumu za koje je poznato da izaziva konzistentan odgovor (npr. aceton: maslinovo ulje), može doći do nekih propisanih situacija u kojima će biti potrebno testiranje nestandardnog vehikuluma (klinički/hemijski relevantna formulacija). U takvim situacijama se ispituje moguća interakcija pozitivne kontrole sa ovim nekonvencionalnim vehikulumom.

*1.3.2.3. Broj životinja, dozni nivoi i izbor vehikuluma.*

Ispitivanje se vrši na najmanje četiri životinje po doznoj grupi, sa najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, plus grupa negativne kontrole koja se tretira samo vehikulumom za ispitivanu supstancu i, ako odgovara, pozitivna kontrola. U slučajevima u kojima se prikupljaju podaci o pojedinačnim životinjama, koristi se najmanje pet životinja po doznoj grupi. Osim u slučaju odsustva tretmana ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi se postupa na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Izbor doze i vehikuluma je zasnovan na preporukama iz literature**1**. Doze se biraju iz niza koncentracija: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, itd. Kada su dostupni, razmatraju se postojeći podaci o akutnoj toksičnosti i iritaciji kože prilikom izbora tri uzastopne koncentracije tako da najveća koncentracija maksimizuje izlaganje uz izbegavanje sistemske toksičnosti i prekomerne lokalne iritacije kože**2, 11**.

Vehikulum se bira na osnovu maksimizacije ispitivanih koncentracija i rastvorljivosti uz pravljenje rastvora/suspenzije koja odgovara za primenu ispitivane supstance. Preporučeni vehikulumi (navedeni od više ka manje odgovarajućim) su aceton/maslinovo ulje (4:1 v/v), dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol i dimetil sulfoksid**2, 10**, ali se mogu koristiti i drugi uz zadovoljavajuće naučno obrazloženje. U određenim situacijama može da bude neophodno da se koristi klinički relevantni rastvarač ili komercijalna formulacija u kojoj se ispitivana supstanca stavlja na tržište kao dodatna kontrola. Posebna pažnja se posvećuje da se obezbedi da se hidrofilni materijali inkorporiraju u sistem vehikuluma, koji vlaži kožu i ne skida se trenutno. Izbegavaju se potpuno vodeni vehikulumi.

**1.3.3. Postupak ispitivanja**

*1.3.3.1. Eksperimentalni raspored*

Eksperimentalni raspored studije:

Dan 1:

Pojedinačno se identifikuju životinje i beleži se telesna masa svake životinje. Započinje se aplikaciju 25 µl odgovarajućeg rastvora ispitivane supstance, samog vehikuluma ili pozitivne kontrole (kako je odgovarajuće) na poleđinu svakog uha.

Dani 2 i 3:

Ponavlja se postupak aplikacije koji je primenjen dana 1.

Dani 4 i 5:

Bez tretmana.

Dan 6:

Beleži se telesna masa svake životinje. Ubrizgava se 250 µl rastvora soli sa fosfatnim puferom (u daljem tekstu: PBS) koja sadrži 20 µCi (7.4e + 8 Bq) 3H - metil timidina svim ispitivanim i kontrolnim miševima putem repne vene. Alternativno se ubrizgava 250 µl PBS koji sadrži 2 µCi (7.4e + 7 Bq) 125I jododeoksiuridina i 10-5 M fluorodeoksiuridina svim miševima putem repne vene.

Posle pet sati životinje se lišavaju života na human način. Iseku se ušni drenažni limfni čvorovi svakog uha i sakupljaju u PBS za svaku eksperimentalnu grupu (pristup zbirne tretirane grupe). Alternativno se mogu iseći parovi limfnih čvorova pojedinačnih životinja i staviti u PBS za svaku životinju (individualni pristup). Detalji i dijagrami identifikacije čvorova i disekcije dati su u literaturi**10**.

*1.3.3.2. Priprema suspenzija ćelija*

Jedna suspenzija ćelija limfnih čvorova (u daljem tekstu: LNC) od zbirnih tretiranih grupa ili obostrano od pojedinačnih životinja priprema se nežnim mehaničkim razdavanjem kroz gazu od nerđajućeg čelika mrežice 200 µm. Ćelije limfnog čvora dva puta se ispiraju s preostalim PBS i talože sa 5% trihlorsirćetnom kiselinom (u daljem tekstu: TCA) na 4° C tokom 18 sati**2**. Zrnca se ponovno suspenduju u 1 ml TCA i prenose u scintilacijske bočice koje sadrže 10 ml scintilacione tečnosti za 3H-brojanje ili se direktno prenose u epruvete za gama brojenje za 125I-prebrojavanje.

*1.3.3.3. Određivanje proliferacije ćelija (inkorporirana radioaktivnost)*

Inkorporiranje 3H-metil timidina se meri β-scintilacionim brojanjem kao raspadanje po minuti (u daljem tekstu: DPM). Inkorporiranje 125I-jododeoksiuridina se meri 125I-brojanjem i izražava kao DPM. Zavisno od pristupa, dodavanje se izražava kao DPM/tretirana grupa (pristup zbirne tretirane grupe) ili DPM/životinja (individualni pristup).

*1.3.3.4. Zapažanja*

1.3.3.4.1. Klinička zapažanja

Životinje se pažljivo pregledaju jednom dnevno zbog kliničkih znakova, bilo lokalne iritacije na mestu aplikacije ili zbog sistemske toksičnosti. Sva zapažanja se sistematično beleže u pojedinačnim dokumentima koji se vode za svaku životinju.

1.3.3.4.2. Telesna masa

Kako je navedeno u odeljku 1.3.3.1. ove metode individualne telesne mase životinja se mere na početku ispitivanja i prilikom planiranog lišavanja života na human način životinja.

**1.3.4. Izračunavanje rezultata**

Rezultati su izraženi kao indeks stimulacije (u daljem tekstu: SI). Kada se koristi pristup zbirne tretirane grupe, SI se dobija deljenjem zbirne radioaktivne inkorporacije za svaku tretiranu grupu sa inkorporacijom zbirne grupe kontrole vehikuluma. Na ovaj način se dobija srednji SI. Prilikom korišćenja individualnog pristupa, SI se dobija deljenjem srednje DPM/životinja unutar svake grupe ispitivane supstance i grupe pozitivne kontrole srednjom DPM/životinja za kontrolnu grupu rastvarača/vehikuluma. Srednji SI za kontrole tretirane vehikulumom je tada 1.

Korišćenje individualnog pristupa za izračunavanje SI omogućava statističku analizu podataka. Prilikom izbora odgovarajuće metode statističke analize istraživač vodi računa o mogućim nejednakostima varijansi i drugim relevantnim problemima koji mogu da zahtevaju transformaciju podataka ili neparametarske statističke analize. Adekvatni pristup za interpretaciju podataka je da se ocene svi individualni podaci tretiranih i kontrola vehikuluma i da se iz njih izvede najbolja kriva doza - odgovor, uzimajući u obzir granice pouzdanosti**8, 12, 13**. Istraživač vodi računa o mogućim "nepodobnim" reakcijama kod pojedinih životinja unutar grupe koje mogu zahtevati korišćenje alternativne mere odgovora (npr. mediana, a ne srednja vrednost) ili eliminaciju nepodobnih rezultata.

Proces donošenja odluka u pogledu pozitivnog odgovora uključuje indeks stimulacije ≥ 3 zajedno sa razmatranjem odnosa doza-odgovor i, kada odgovara, statistički značaj**3, 6, 8, 12, 14.**

Ukoliko je neophodno razjasniti dobijene rezultate, razmatraju se razna svojstva ispitivane supstance, uključujući i to da li ima strukturne sličnosti sa supstancama za koje je poznato da su senzibilišuće za kožu, da li uzrokuje prekomernu iritaciju kože i prirodu opaženog odnosa doze i odgovora. Ova i druga pitanja detaljno su razmatrana na drugom mestu**7**.

**2. PODACI**

Podaci se navode tabelarno. Navode se srednje i pojedinačne DPM vrednosti i indeksi stimulacije za svaku doznu grupu (uključujući kontrolu vehikuluma).

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- identifikacioni podaci (npr. CAS broj, ukoliko je dostupan; izvor; čistoću; poznate nečistoće; broj serije);

- fizičku prirodu i fizička i hemijska svojstva (npr. isparljivost, stabilnost, rastvorljivost);

- u slučaju smeše, sastav i relativna zastupljenost (procenat) sastojaka.

2) Vehikulumu:

- identifikacioni podaci (čistoća; koncentracija, gde odgovara; korišćena zapremina);

- opravdanje za izbor vehikuluma.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- soj korišćenih miševa;

- mikrobiološki status životinja, kada je poznat;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor životinja, uslovi smeštaja, ishrana, itd.

4) Uslovima ispitivanja:

- detalji o pripremi ispitivane supstance i primeni;

- opravdanje za izbor doze, uključujući rezultate studije raspona, ukoliko je obavljena; korišćen vehikulum i koncentracije ispitivane supstance i ukupna količina primenjene supstance;

- detalji o kvalitetu hrane i vode (uključujući vrstu ishrane/izvor, izvor vode).

5) Kontroli pouzdanosti:

- sažetak rezultata zadnje provere pouzdanosti uključujući podatke o supstanci, koncentraciji i korišćenom vehikulumu;

- podaci o istovremenoj i/ili istorijskoj pozitivnoj i negativnoj kontroli za laboratoriju koja vrši ispitivanje.

6) Rezultatima:

- pojedinačna telesna masa životinja na početku doziranja i u vreme planiranog lišavanja života na human način;

- tabela srednjih (pristup zbirne tretirane grupe) i individualnih (individualni pristup) DPM vrednosti kao i raspon vrednosti za oba pristupa i stimulacioni indeksi za svaku doznu grupu (uključujući kontrolu vehikuluma);

- statistička analiza, kad to odgovara;

- vreme pojave i znaci toksičnosti, uključujući iritaciju kože na mestu primene, ukoliko ih ima, za svaku životinju.

7) Obrazloženju rezultata:

- kratak komentar rezultata, analiza odnosa doza - odgovor i statističke analize, kada odgovara, sa zaključkom da li se ispitivana supstanca smatra senzibilišućom za kožu.

**4. LITERATURA**

1. Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165-169.

2. Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13-31.

3. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53, 563-79.

4. Testing Method B.6.

5. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, 999-1002.

6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, 985- 997.

7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology. 36, 327-33.

8. Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology, 146, 49-59.

9. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology, 18, 281-4.

10. National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (http://iccvam.niehs.nih.gov).

11. Testing method B.4.

12. Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control podraživačs in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, 63-67.

13. Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, 261-266.

14. Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis 42, 344-48.

**B.43. STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI KOD GLODARA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 424 (1997).

Metoda ispitivanja je osmišljena za dobijanje podataka potrebnih za potvrdu ili dalju karakterizaciju potencijalne neurotoksičnosti hemikalija kod odraslih životinja. Može se kombinovati sa postojećim metodama ispitivanja za studije toksičnosti ponovljene doze ili obavljati kao posebna studija. Preporučuje se konsultacija OECD vodiča**1** oko pomoći pri osmišljavanju studije zasnovane na ovoj metodi ispitivanja. Navedeno je posebno važno kod razmatranja modifikacija opažanja i postupaka ispitivanja kao što se preporučuje za rutinsku primenu ove metode. Pripremljen je dokument sa smernicama kako bi omogućio izbor drugih postupaka ispitivanja za upotrebu u posebnim okolnostima.

Procena razvojne neurotoksičnosti nije predmet ove metode.

*1.1. UVOD*

U proceni i evaluaciji toksičnih karakteristika hemikalija važno je uzeti u obzir potencijal za neurotoksične efekte. Metoda za sistemsku toksičnost, ponovljena doza već uključuje posmatranja koja se odnose na potencijalnu neurotoksičnost. Ova metoda ispitivanja može se koristiti pri osmišljavanju studije za dobijanje daljih podataka o ili za potvrdu neurotoksičnih efekata opaženih u studijama za sistemske toksičnost, ponovljena doza. Razmatranje potencijalne neurotoksičnosti određenih grupa hemikalija može ukazati na to da se one mogu odgovarajuće oceniti ovom metodom bez prethodnih indikacija potencijalne neurotoksičnosti iz studija sistemske toksičnosti, ponovljena doza. Takva razmatranja npr. uključuju:

- posmatranje neuroloških znakova ili neuropatoloških lezija u studijama toksičnosti različitih od onih iz studija sistemsku toksičnost, ponovljena doza ili

- strukturnu vezu ili druge podatke koji ih povezuju sa poznatim neurotoksikantima.

Može da bude i drugih slučajeva u kojima je korišćenje ove metode ispitivanja prikladno (za detalje videti literaturu**1**).

Ova metoda je razvijena da se prilagodi da zadovolji posebne potrebe za potvrdom specifične histopatološke i bihevioralne neurotoksičnosti hemikalije, kao i da obezbedi karakterizaciju i kvantifikaciju neurotoksičnih reakcija.

U prošlosti se neurotoksičnost izjednačavala sa neuropatijom uključujući neuropatološke lezije ili neurološke disfunkcije kao što su napadi, paraliza ili tremor. Iako je neuropatija važna manifestacija neurotoksičnosti, jasno je da postoje mnogi drugi znaci toksičnosti za nervni sistem (npr. gubitak motorne koordinacije, deficiti čula, disfunkcije učenja i pamćenja) koji se ne moraju oslikavati u neuropatiji ili drugim vrstama studija.

Metoda ispitivanja neurotoksičnosti je osmišljena da detektuje glavne neurobihevioralne i neuropatološke efekte kod odraslih glodara. Bihevioralni efekti, čak i odsustvu morfoloških promena, mogu da održavaju štetni uticaj na organizam, ali nisu sve bihevioralne promene specifične za nervni sistem. Zbog toga, bilo koje promene koje su opažene ocenjuju se u vezi sa korelativnim histopatološkim, hematološkim ili biohemijskim podacima kao i sa podacima o drugim tipovima sistemske toksičnosti. Ispitivanje koje se obavlja u ovoj metodi je usmereno na davanje karakterizacije i kvantifikacije neurotoksičnih efekata što uključuje specifične histopatološke i bihevioralne postupke koji mogu biti nadalje podržani elektrofiziološkim i/ili biohemijskim istraživanjima**1, 2, 3, 4**.

Neurotoksikanti mogu da deluju na brojna ciljna mesta u okviru nervnog sistema i putem različitih mehanizama. Nijedan sistem ispitivanja ne može u potpunosti da proceni neurotoksični potencijal svih supstanci, pa može biti korisno iskoristiti druga *in vivo* ili *in vitro* ispitivanja koja su specifična za tip opažene ili predviđene neurotoksičnosti.

Ova metoda ispitivanja može da se koristi zajedno sa smernicama datim u OECD vodiču**1** kako bi se osmislile studije čija je namera da dalje karakterišu ili povećaju osetljivost kvantifikacije odnosa doza-odgovor kako bi bolje ocenili dozu bez štetnog efekta ili potvrdili poznatu ili verovatnu opasnost od hemikalije. Mogu se osmisliti studije koje identifikuju i ocenjuju neurotoksični mehanizam (mehanizme) ili potkrepljuju već raspoložive podatke korišćenjem postupaka neurobihevioralne i neuropatološke opservacije. Takve studije ne kopiraju podatke koji bi bili generisani korišćenjem standardnih postupaka preporučenih u ovoj metodi. Podaci su već dostupni i nisu neophodni za tumačenje rezultata studije.

Metoda ispitivanja neurotoksičnosti, kad se primenjuje sama ili u kombinaciji, daje rezultate koji mogu:

- da identifikuju da li je nervni sistem trajno ili reverzibilno pod uticajem ispitivane hemikalije;

- da doprinesu karakterizaciji promena nervnog sistema koje se povezuju sa izlaganjem hemikaliji i razumevanju relevantnog mehanizma;

- da odrede odnose doza - odgovor i vreme - odgovor kako bi se procenila doza bez štetnog efekta (koja se može koristiti pri uspostavljanju bezbednosnih kriterijuma za hemikaliju).

Ova eksperimentalna metoda koristi oralnu primenu ispitivane supstance. Drugi putevi primene (npr. dermalni ili inhalacioni) mogu biti prikladniji i mogu zahtevati modifikaciju preporučenih postupaka. Razmatranja o izboru puta primene zavise od profila ljudskog izlaganja i raspoloživih toksikoloških ili kinetičkih informacija.

*1.2. DEFINICIJE*

Štetni efekat jeste bilo koja promena u odnosu na osnovno stanje koja je povezana sa tretmanom i koja umanjuje sposobnost organizma da preživi, razmnožava se ili se prilagodi životnoj sredini.

Doza jeste količina primenjene ispitivane supstance. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili kao konstantna koncentracija u hrani (ppm).

Doziranje jeste opšti pojam koji se sastoji od doze, njene frekvencije i trajanja doziranja.

Neurotoksičnost jeste štetna promena u strukturi ili funkciji nervnog sistema koja je posledica izlaganja hemijskom, biološkom ili fizičkom agensu.

Neurotoksikant jeste bilo koja hemikalija, biološki ili fizički agens koji ima potencijal da uzrokuje neurotoksičnost.

NOAEL jeste skraćenica za dozu bez štetnog efekta (no-observed-adverse effect level) i predstavlja najviši nivo doze pri kome nisu opaženi štetni efekti povezani sa tretmanom.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca se primenjuje oralnim putem u rasponu doza na nekoliko grupa laboratorijskih glodara. Obično su potrebne ponovljene doze i režim doziranja može biti 28 dana, subhronično (90 dana) ili hronično (1 godina ili duže). Postupci opisani u ovoj eksperimentalnoj metodi mogu se koristiti i u studiji akutne neurotoksičnosti. Ispitivanje na životinjama vrši se kako bi se omogućila detekcija ili karakterizacija bihevioralnih i/ili neuroloških abnormalnosti. Raspon ponašanja na koje utiču neurotoksikanti procenjuje se tokom perioda posmatranja. Na kraju ispitivanja, podgrupa životinja oba pola iz svake grupe uzorkuje se in situ i pripremaju se i ispituju preseci mozga, kičmene moždine i perifernih nerava.

Tokom izvođenja studije kao samostalne studije za skrining neurotoksičnosti ili za karakterizaciju neurotoksičnih efekata, životinje u svakoj grupi koje se ne koriste za uzorkovanje i kasnija histopatološka ispitivanja (videti Tabelu 1.) mogu biti korišćene za specifične neurobihevioralne, neuropatološke, neurohemijske ili elektrofiziološke postupke koji mogu zameniti podatke dobijene standardnim ispitivanjima koje zahteva ova metoda**1**. Ovi dodatni postupci mogu biti posebno korisni kada empirijska posmatranja ili očekivani efekti ukazuju na specifičnu vrstu ili ciljno mesto neurotoksičnosti hemikalije. Preostale životinje se mogu koristiti za procene kao što su one koja zahtevaju metode ispitivanja za studije toksičnosti, ponovljena doza kod glodara.

Kad se postupci iz ove metode ispitivanja kombinuju sa onima iz drugih metoda, potreban je dovoljan broj životinja kako bi se zadovoljili zahtevi za posmatranja iz obe studije.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Izbor životinjske vrste**

Preporučena vrsta glodara je pacov, mada se uz opravdanje mogu koristiti i druge vrste. Koriste se uobičajeni laboratorijski sojevi zdravih mladih odraslih životinje. Koriste se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu trudne. Doziranje se uobičajeno počinje što je ranije moguće posle odbijanja od sise, najbolje ne kasnije nego što životinje navrše šest nedelja i u svakom slučaju pre nego životinje navrše devet nedelja. Kada se ova studija kombinuje sa drugim studijama, ova starost se može prilagoditi. Na početku studije varijacija u telesnoj masi životinja ne sme da prelazi ± 20% srednje mase za svaki pol. Kada se obavlja kratkoročna studija ponovljene doze kao preliminarna dugoročnoj studiji, u obe studije se koriste životinje istog soja i iz istog izvora.

**1.4.2. Uslovi smeštaja i ishrane**

Temperatura prostorija za eksperimentalne životinje je 22° C (± 3 °C). Relativna vlažnost je najmanje 30% i da ne prelazi 70% osim za vreme čišćenja prostorija. Ciljna vlažnost je 50% do 60%. Svetlo je veštačko sa sekvencama od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Buka se smanjuje na minimum. Može se koristiti konvencionalna laboratorijska ishrana uz neograničene količine vode za piće.

Izbor ishrane može biti uslovljen potrebom da se obezbedi odgovarajuća smeša ispitivane supstance koja se primenjuje ovom metodom. Životinje se smeštaju pojedinačno ili se drže u malim grupama istog pola.

**1.4.3. Priprema životinja**

Zdrave mlade životinje se slučajnim izborom raspoređuju u grupe. Kavezi se raspoređuju na način da se svedu na minimum mogući efekti zbog njihovog rasporeda. Životinje se jedinstveno identifikuju i drže u kavezima najmanje pet dana pre početka ispitivanja kako bi se aklimatizovale na laboratorijske uslove.

**1.4.4. Put primene i priprema doza**

Ova metoda ispitivanja posebno se odnosi na oralnu primenu ispitivane supstance. Oralna primena može biti putem prisilnog hranjenja, putem hrane, vode za piće ili kapsulama. Drugi putevi primene (npr. dermalni ili inhalacioni) mogu se koristiti ali zahtevaju modifikaciju preporučenih postupaka. Razmatranja o izboru puta primene zavise od profila izlaganja ljudi i raspoloživih toksikoloških ili kinetičkih podataka. Naznačava se objašnjenje za izbor puta primene kao i modifikacije postupaka ove metode ispitivanja.

Kad je neophodno, ispitivana supstanca se može rastvoriti ili suspendovati u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje se korišćenje vodenog rastvora/suspenzije kao prvi izbor, zatim razmatranje primene rastvora/suspenzije u ulju (npr. kukuruzno ulje) i zatim mogući rastvori/suspenzije u drugom vehikulumu. Toksične karakteristike vehikuluma moraju biti poznate. Razmatraju se i sledeće karakteristike vehikuluma: efekti vehikuluma na apsorpciju, raspodelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance koji mogu izmeniti njene toksične karakteristike; kao i efekte unosa hrane ili vode ili nutritivni status životinja.

*1.5. POSTUPCI*

**1.5.1. Broj i pol životinja**

Kada se studija izvodi kao posebna studija, koristi se najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka) u svakoj doznoj i kontrolnoj grupi za ocenjivanja detaljnih kliničkih i funkcionalnih opažanja. Od najmanje pet mužjaka i pet ženki odabranih od tih 10 mužjaka i 10 ženki, uzimaju se uzorci in situ i isti se koriste za detaljnu neurohistopatologiju na kraju studije. U slučajevima kada se na znakove neurotoksičnih efekata posmatra samo ograničen broj životinja u datoj doznoj grupi, razmatra se da se te životinje uključe među one odabrane za uzorkovanje. Kada se studija obavlja u kombinaciji sa studijom toksičnosti sa ponovljenom dozom, koristi se odgovarajući broj životinja kako bi se zadovoljili ciljevi obe studije. Minimalni broj životinja po grupi za razne kombinacije ispitivanja je prikazan u Tabeli 1. Ukoliko se planiraju lišavanja života na human način tokom ispitivanja ili ukoliko se planiraju grupe za oporavak za posmatranje reverzibilnosti, perzistencije ili odložene pojave toksičnih efekata posle tretmana ili kada se razmatraju dodatna posmatranja, broj životinja se povećava kako bi se obezbedilo da bude dostupan dovoljan broj životinja potrebnih za posmatranje i histopatologiju.

**1.5.2. Tretirana i kontrolna grupa**

Koristi se najmanje tri dozne i jednu kontrolnu grupu, ali ukoliko se iz procene drugih podataka ne očekuju efekti pri ponovljenoj dozi od 1.000 mg/kg telesna masa/dan, može se obaviti ispitivanje granične doze. Ukoliko nema raspoloživih odgovarajućih podataka, može se izvesti studija traženja raspona kao pomoć pri određivanju doza koje bi se koristile. Osim tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi se postupa isto kao sa onima iz ispitivane grupe. Ukoliko se pri primeni ispitivane supstance koristi vehikulum, kontrolna grupa prima vehikulum u najvećoj zapremini koja se koristi.

**1.5.3. Provera pouzdanosti**

Laboratorija koja obavlja studiju navodi podatke kojima dokazuje svoju mogućnost da izvede ispitivanje i osetljivost korišćenih postupaka. Takvi podaci pružaju dokaze o mogućnosti detekcije i kvantifikacije, kako odgovara, promenama u različitim pokazateljima ispitivanja preporučenim za posmatranje, kao što su autonomni znaci, senzorska reaktivnost, snaga hvatanja i motorna aktivnost. Podaci o hemikalijama koji uzrokuju različite vrste neurotoksičnih efekata i koji se mogu koristiti kao supstance pozitivne kontrole nalaze se u literaturi**2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9**. Istorijski podaci mogu se koristiti ukoliko ključni aspekti eksperimentalnih postupaka ostanu isti. Periodično ažuriranje istorijskih podataka se preporučuje. Novi podaci koji pokazuju neprekidnu osetljivost postupaka treba da budu razvijeni kada se promeni neki ključni element izvođenja ispitivanja ili postupka od strane laboratorije.

**1.5.4. Izbor doza**

Nivoi doza se biraju uzimajući u obzir bilo koju ranije uočenu toksičnost i raspoložive kinetičke podatke za ispitivano jedinjenje ili slične materijale. Najviša doza se bira sa ciljem izazivanja neurotoksičnih efekata ili jasnih sistemskih toksičnih efekata. Potom se bira opadajući niz doznih nivoa sa ciljem dokazivanja bilo kog odgovora koji je u vezi sa dozom i NOAEL pri najnižem doznom nivou. Doze se određuju tako da primarni toksični efekti na nervni sistem mogu da se razlikuju od efekata koji se povezuju sa sistemskom toksičnošću. Dva do tri intervala su često optimum i pored četvrte ispitivane grupe, često se preporučuje da se koriste vrlo veliki intervali (npr. više od faktora 10) između doza. Kada postoji dobra procena ljudske izloženosti, to se takođe uzima u obzir.

**1.5.5. Ispitivanje granične doze**

Ukoliko studija korišćenjem jedne doze od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem opisanih postupaka, ne pokaže nikakve neurotoksične efekte, i ako se toksičnost ne može očekivati na osnovu podataka o strukturno sličnim jedinjenjima, studija u kojoj bi se koristile tri doze ne smatra se neophodnom. Očekivana izloženost ljudi može indikovati potrebu za korišćenjem veće oralne doze u ispitivanju granične doze. Za druge puteve primene kao što su inhalacija ili dermalna primena, fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance često mogu diktirati maksimalni nivo izlaganja. Za izvođenje studije akutne oralne toksičnosti, doza za ispitivanje granične doze je najmanje 2.000 mg/kg.

**1.5.6. Primena doza**

Životinje se svakodnevno doziraju ispitivanom supstancom, sedam dana nedeljno, tokom perioda od najmanje 28 dana. Korišćenje petodnevnog režima doziranja ili kraćeg izlaganja treba da bude opravdano. Kad se ispitivana supstanca primenjuje prisilnim hranjenjem, isto se čini u jednoj dozi korišćenjem trbušne cevi ili odgovarajućom intubacionom kanulom. Maksimalna zapremina tečnosti koji može biti primenjena zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme da prelazi 1 ml/100 g TM. Ipak, u slučaju vodenih rastvora može se uzeti u obzir korišćenje do 2 ml/100 g TM. Osim kod iritativnih i korozivnih supstanci koje će uobičajeno pokazati intenzivnije efekte pri višim koncentracijama, varijabilnost u ispitivanoj zapremini se minimizuje podešavanjem koncentracije kako bi se osigurao konstantna zapremina pri svim nivoima doze.

Za supstance koje se primenjuju putem hrane ili vode za piće, važno je osigurati da količine ispitivane supstance ne ometaju normalnu prehranu ili ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca primenjuje u hrani bilo kao konstantna prehrambena koncentracija (ppm) ili kada se koristi konstanti dozni nivo u smislu telesne mase životinja, alternativa se naznačava. Za supstance koje se primenjuju prisilnim hranjenjem, doza se primenjuje u slično vreme svakog dana i prilagođena je kako bi se zadržao konstantan dozni nivo u smislu telesne mase životinje. Kada se koristi ispitivanje sa ponovljenom dozom kao prethodno ispitivanje za dugoročnu studiju, onda se u obe studije koristi slična prehrana. Za studije akutne toksičnosti ako nije moguće dati jednu dozu, doza se može davati u manjim delovima tokom perioda koji ne prelaze 24 sata.

*1.6. POSMATRANJA*

**1.6.1. Učestalost posmatranja i ispitivanja**

Kod studija sa ponovljenom dozom, period posmatranja pokriva period doziranja. Kod studija akutne toksičnosti, posmatra se 14-dnevni period posle tretmana. Kod životinja u pratećim grupama koje se drže bez izlaganja za vreme posle tretmana, posmatranja pokriva i ovaj period.

Posmatranja se obavljaju dovoljno često kako bi se povećala verovatnost detekcije bilo kojih bihevioralnih i/ili neuroloških abnormalnosti. Posmatranja se obavljaju po mogućstvu u isto vreme svakog dana uzimajući u obzir period u kome se očekuje pojava efekata posle doziranja. Frekvencija kliničkih posmatranja i funkcionalnih testova je data u Tabeli 2. Ukoliko kinetički ili drugi podaci koji su dobijeni u prethodnim studijama ukazuju na potrebu posmatranja u drugačijim periodima, usvaja se alternativni raspored kako bi se prikupio maksimalan broj informacija. Daje se objašnjenje za promenu rasporeda.

*1.6.1.1. Posmatranja opšteg zdravstvenog stanja i mortaliteta/morbiditeta*

Zdravstveno stanje svih životinja pažljivo se posmatra najmanje jednom dnevno, a dva puta dnevno posmatraju se mortalitet i morbiditet.

*1.6.1.2. Detaljna klinička posmatranja*

Na životinjama koje su izabrane za tu svrhu obavljaju se detaljna klinička opažanja (videti Tabelu 1) jednom pre prvog izlaganja (kako bi se omogućila upoređivanja kod jedne jedinke) i u različitim intervalima u zavisnosti od trajanja studije (videti Tabelu 2). Detaljna klinička posmatranja na pratećim grupama obavljaju se na kraju perioda oporavka. Detaljna klinička opažanja se obavljaju izvan kaveza u standardnoj areni. Opažanja se pažljivo beleže korišćenjem sistema ocenjivanja koji uključuje kriterijume ili skale za svaku meru. Laboratorija jasno definiše kriterijume ili skale. Treba uložiti napor kako bi se obezbedilo da varijacije u uslovima ispitivanja budu minimalne (ne sistematično povezane sa tretmanom) i da posmatranja obavljaju obučeni posmatrači koji nisu upoznati sa tretmanom.

Preporučljivo je struktuirano obavljati posmatranja po dobro definisanim kriterijuma (uključujući definiciju "normalnog raspona") i sistematično ih primeniti na svaku životinju u svakom periodu posmatranja. "Normalni raspon" se adekvatno dokumentuje. Beleže se svi uočeni znakovi. Kad god je moguće beleži se i veličina uočenih znakova. Klinička opažanja uključuju, ali nisu ograničena na, promene na koži, krznu, očima, sluznicama, pojava sekreta i ekskreta i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija, piloerekcija, veličina zenice, neobičan način disanja i/ili disanje na usta, bilo koje neobične znakove uriniranja ili defekacije i bezbojni urin).

Beleže se i bilo koji neuobičajeni efekti u pogledu položaja tela, nivoa aktivnosti (npr. povećano ili smanjeno istraživanje standardne arene) i koordinacije pokreta. Promene u držanju (npr. klaćenje, ataksija), stavu (npr. pogrbljenost) i reakciji na postupanje, smeštanje ili drugi stimulusi okoline kao i prisustvo kloničnih ili toničnih pokreta, konvulzija ili tremora, stereotipa (npr. preterano timarenje, neobični pokreti glave, ponavljajuće kretnje u krug) ili čudno ponašanje (npr. griženje ili preterano lizanje, samosakaćenje, hod unazad, vokalizacija) ili agresija takođe se beleže.

*1.6.1.3. Funkcionalna ispitivanja*

Slično detaljnim kliničkim posmatranjima, funkcionalna ispitivanja se takođe obavljaju pre izlaganja, kao i često posle toga, na svim životinjama koje su izabrane za tu svrhu (videti Tabelu 1). Učestalost funkcionalnih ispitivanja takođe zavisi od trajanja studije (videti Tabelu 2). Pored perioda posmatranja iz Tabele 2, obavljaju se funkcionalna ispitivanja na pratećim grupama sve do usmrćenja. Funkcionalna ispitivanja uključuju senzornu reaktivnost na stimuluse raznih vrsta (npr. zvučni, vizuelni i proprioceptivni stimulusi**5, 6, 7** ocenjivanje snage stiska**8** i ocenjivanje motorne aktivnosti**9**). Motorna aktivnost se meri automatskom spravom kojom je moguće detektovati smanjenu i povećanu aktivnost. Ukoliko se koristi drugi definisani sistem, on je kvantitativan i njegovu osetljivost i pouzdanost treba pokazati. Svaki uređaj se testira kako bi se osigurala pouzdanost tokom vremena i konzistentnost između uređaja. Više detalja o postupcima koji se prate nalazi se u literaturi. Ukoliko nema podataka (npr. struktura - aktivnost, epidemiološki podaci, druge studije toksičnosti) koji bi ukazivali na potencijalne neurotoksične efekte, razmatra se uključivanje specijalizovanijih testova senzorne ili motorne funkcije ili učenja i pamćenja kako bi se detaljnije proučili ti mogući efekti. Više podataka o specijalizovanim testovima dato je u literaturi**1**.

Izuzetno, životinje koje pokazuju znakove toksičnosti u obimu koji značajno ometa funkcionalno ispitivanje mogu biti izostavljene iz tog ispitivanja. Daje se opravdanje za isključivanje tih životinja iz funkcionalnog ispitivanja.

**1.6.2. Telesna masa i potrošnja hrane/vode**

Za studije koje traju do 90 dana sve životinje se mere najmanje jednom nedeljno i meri se potrošnja hrane (potrošnju vode kada se ispitivana supstanca unosi tim putem) takođe najmanje jednom nedeljno. Za dugoročne studije sve životinje se mere najmanje jednom nedeljno prvih 13 nedelja, a potom najmanje jednom na svake 4 nedelje. Meri se potrošnja hrane (potrošnju vode kada se ispitivana supstanca unosi tim putem) takođe najmanje jednom nedeljno tokom prvih 13 nedelja, a kasnije u približno tromesečnim intervalima osim ukoliko zdravstveno stanje ili promena telesne mase ne nalažu drugačije.

**1.6.3. Oftalmološka ispitivanja**

Za studije koje traju duže od 28 dana obavlja se oftalmološki pregled uz korišćenje oftalmoskopa ili sličnog odgovarajućeg instrumenta, pre primene ispitivane supstance i po završetku studije, najbolje na svim životinjama, ali najmanje na onima iz grupa visoke doze i iz kontrolne grupe.

Ukoliko se primete promene u očima ili ukoliko klinički znaci ukazuju na potrebu, pregledaju se sve životinje. Kod dugoročnih studija oftalmološki pregled se obavlja u 13. nedelji. Oftalmološki pregledi se ne obavljaju ukoliko su ovi podaci već dostupni iz drugih studija sličnog trajanja i sličnih doznih nivoa.

**1.6.4. Hematološka i medicinsko-biohemijska ispitivanja**

Kada se izvodi studija neurotoksičnosti u kombinaciji sa studijom sistemske toksičnosti sa ponovljenom dozom, rade se hematološka ispitivanja i medicinsko-biohemijska određivanja kako je izloženo u metodi ispitivanja sistemske toksičnosti. Prikupljanje uzoraka se obavlja tako da bilo koji potencijalni efekti na neuropatologiju budu svedeni na minimum.

**1.6.5. Histopatološka ispitivanja**

Neuropatološki pregled je osmišljen tako da dopuni i proširi opažanja iz *in vivo* faze studije. Tkiva najmanje 5 životinja/pol/grupa (videti Tabelu 1. i sledeći pasus ovog odeljka) se fiksiraju in situ, korišćenjem opštepriznatih tehnika perfuzije i fiksacije (videti literaturu**3, 4**). Bilo koje uočljive promene se beleže. Kad se studija izvodi kao samostalna studija za proveru neurotoksičnosti ili za karakterizaciju neurotoksičnih efekata, preostale životinje mogu biti korišćene bilo za specifične neurobihevioralne**10, 11**, neuropatološke**10, 11, 12, 13**, neurohemijske**10, 11, 14, 15** ili elektrofiziološke**10, 11, 16, 17** postupke kao dopuna postupcima i ispitivanjima koji su ovde opisani ili za povećanje broja jedinki pregledanih za histopatologiju. Ovi dodatni postupci su od posebne koristi kad empirijska opažanja ili očekivani efekti ukazuju na specifični tip ili ciljno mesto neurotoksičnosti**2, 3**. Alternativno, preostale životinje mogu da se podvrgnu rutinskom patološkom ocenjivanju kako je opisano u metodi za studije sa ponovljenom dozom.

Opšti postupak bojenja kao što je hematoksilin i eozin (u daljem tekstu: H&E) obavlja se za sve uzroke tkiva u parafinu i izvodi se mikroskopski pregled. Ukoliko se uoče znaci periferne neuropatije ili ako se na iste sumnja, ispituju se uzorci perifernog nervnog tkiva u plastici. Klinički znaci takođe mogu naznačiti dodatna mesta za ispitivanje ili korišćenje posebnih postupaka bojenja. Uputstvo o dodatnim mestima dato je u literaturi**3, 4**. Odgovarajuće specijalne boje za pokazivanje specifičnih tipova patoloških promena mogu biti od pomoći**18**.

Na reprezentativnim presecima centralnog i perifernog nervnog sistema vrši se histološki pregled (videti u literaturi**3,4**). Ispitivana područja obično uključuju: prednji mozak, središte cerebruma, uključujući presek kroz hipokampus, srednji mozak, cerebelum, pons, produžena moždina, oko sa optičkim nervom i retinom, kičmenu moždinu i cervikalna i lumbalna zadebljanja, dorzalni koren ganglia, dorzalna i ventralna vlakna korenova, proksimalni išijasni nerv, proksimalni tibijalni nerv (u kolenu) i grane tibijalnog nerva za mišić lista. Preseci kičmene moždine i perifernih nerava uključuju i poprečne ili transverzalne i uzdužne preseke. Obraća se pažnja na vaskulaturu nervnog sistema. Uzorak skeletnog mišića, posebno mišića lista, takođe se pregleda. Posebna pažnja se obraća mestima sa celularnom ili fibroznom strukturom i uzorak CNS i PNS za koji se zna da je posebno pogođen neurotoksikantima.

Smernice o neuropatološkim promenama koje tipično proizilaze iz izlaganja toksikantu date su u literaturi**3, 4**. Preporučuje se postepeno ispitivanje uzoraka tkiva u kome se preseci grupe visoke doze prve upoređuju sa onima iz kontrolne grupe. Ukoliko se ne uoče neuropatološke promene u uzorcima iz ovih grupa, dalja analiza nije potrebna. Ukoliko se uoče neuropatološke promene u grupi visoke doze, uzorak svakog potencijalno pogođenog tkiva iz srednjih i nižih doznih grupa kodira se i redom ispituje.

Ukoliko se pronađu bilo kakve neuropatološke promene u kvalitativnoj analizi, obavlja se drugo ispitivanje na svim područjima nervnog sistema koji pokazuju takve promene. Preseci iz svih doznih grupa svih potencijalno zahvaćenih regija se kodiraju i ispituju nasumce bez poznavanja koda. Frekvenca i ozbiljnost svake lezije se beleže. Pošto se ocene sve regije iz svih grupa kod se može dešifrovati i može se obaviti statistička analiza kako bi se ocenio odnos doza-odgovor. Primeri različitih stepena ozbiljnosti svake lezije se opisuju.

Neuropatološki nalazi se ocenjuju u kontekstu bihejvioralnih posmatranja i merenja, kao i drugih podataka iz prethodnih i istovremenih studija sistemske toksičnosti ispitivane supstance.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Navode se pojedinačni podaci. Svi podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu ili kontrolnu grupu navode se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su pronađene mrtve za vreme ispitivanja ili usmrćene iz humanih razloga, kao i vreme smrti ili humanog lišavanja života na human način, broj koji pokazuje znakove toksičnosti, opis znakova toksičnosti koji su uočeni, uključujući vreme nastanka, trajanje, vrstu i ozbiljnost bilo kojih toksičnih efekata, broj životinja koje pokazuju lezije, uključujući vrstu i ozbiljnost lezija.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Nalazi studije se procenjuju u pogledu incidence, ozbiljnosti i korelacije neurobihevioralnih i neuropatoloških efekata (neurohemijskih ili elektrofizioloških efekata takođe, ukoliko su uključena dodatna ispitivanja) ili bilo kojih drugih uočenih štetnih efekata. Kada je moguće, numerički rezultati se procenjuju odgovarajućom pšteprihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode se biraju prilikom osmišljavanja studije.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda (uključujući izomeriju, čistoću i fizička i hemijska svojstva);

- identifikacioni podaci.

2) Vehikulumu (ako odgovara):

- opravdanje za izbor vehikuluma.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor, uslovi smeštaja, aklimatizacija, ishrana, itd.;

- pojedinačne mase životinja na početku ispitivanja.

4) Uslovima ispitivanja:

- detalji o formulaciji ispitivane supstance/priprema ishrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata:

- specifikacija primenjenih doza, uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primenjenog materijala;

- detalji o primeni ispitivane supstance;

- obrazloženje za izabrane nivoe doza;

- obrazloženje za put primene i trajanje izlaganja;

- konverzija koncentracije ispitivane supstance (ppm) iz ishrane/vode za piće u stvarnu dozu (mg/kg telesna masa / dan), ukoliko je primenjivo;

- detalji o kvalitetu hrane i vode.

5) Postupcima ispitivanja i posmatranja:

- detalji o svrstavanju životinja svake grupe u podgrupe za perfuziju;

- detalji o sistemu bodovanja, uključujući kriterijume i skale za svako merenje u detaljnim kliničkim posmatranjima;

- detalji o funkcionalnim ispitivanjima za senzornu reaktivnost na stimuluse različitih vrsta (npr. zvučni, vizuelni i proprioceptivni), za ocenjivanje snage stiska, za ocenjivanje motorne aktivnosti (uključujući detalje o automatskim spravama za detekciju aktivnosti), i drugim korišćenim postupcima;

- detalji o oftalmološkim pregledima i ako odgovara hematološkim ispitivanjima i medicinsko-biohemijskim ispitivanjima sa relevantnim osnovnim vrednostima;

- detalji specifičnih neurobihevioralnih, neuropatoloških, neurohemijskih ili elektrofizioloških postupaka.

6) Rezultatima:

- telesna masa/promene telesne mase, uključujući telesnu masu pri lišavanju života na human način;

- potrošnja hrane i vode, ukoliko je primenljivo;

- podaci o toksičnim efektima po polu i doznom nivou, uključujući znake toksičnosti ili smrtnost;

- priroda, ozbiljnost i trajanje (vreme nastanka i kasniji tok) detaljnih kliničkih nalaza (prolaznih ili ne);

- detaljan opis svih rezultata funkcionalnih ispitivanja;

- nalazi obdukcije;

- detaljan opis svih specifičnih neurobihevioralnih, neuropatoloških, neurohemijskih ili elektrofizioloških nalaza, ukoliko je primenljivo;

- podaci o apsorpciji i metabolizmu, ukoliko su dostupni;

- statistička obrada rezultata, kad je primenjivo.

7) Obrazloženju rezultata:

- podatke o efektu doze;

- odnos drugih toksičnih efekata do zaključka o neurotoksičnom potencijalu ispitivane supstance;

- doza bez štetnog efekta (NOAEL).

8) Zaključku:

- preporučuje specifičan izveštaj o celokupnoj neurotoksičnosti ispitivane hemikalije.

**4. LITERATURA**

1. OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, InPreparation.

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.In preparation.

3. World Health Organisation (WHO) (1986) Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

6. Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T., (1979) A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds., (1992) Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed., (1995) Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B., (1991) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

14. O‘Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

15. O‘Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378. L 142/428 EN Official Journal of the European Union 31.5.2008

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

17. Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/ London, p. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tabela 1: Minimalni broj životinja po grupi kada se studija neurotoksičnosti izvodi odvojeno ili u kombinaciji s drugim studijama

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI SPROVEDENA KAO | | | |
| Posebna studija | Kombinovana  sa 28-dnevnom studijom | Kombinovana  sa 90-dnevnom studijom | Kombinovana sa studijom hronične toksičnosti |
| Ukupan broj životinja po grupi | 10 mužjaka i 10 ženki | 10 mužjaka i 10 ženki | 15 mužjaka i 15 ženki | 25 mužjaka i 25 ženki |
| Broj životinja odabranih za funkcionalna ispitivanja uključujući detaljno kliničko posmatranje | 10 mužjaka i 10 ženki | 10 mužjaka i 10 ženki | 10 mužjaka i 10 ženki | 10 mužjaka i 10 ženki |
| Broj životinja odabran za uzorkovanje in situ i neurohistopatologiju | 5 mužjaka i 5 ženki | 5 mužjaka i 5 ženki | 5 mužjaka i 5 ženki | 5 mužjaka i 5 ženki |
| Broj životinja odabran za posmatranja toksičnosti ponovljene doze/subhronične/hronične, hematologiju, medicinsku biohemiju, histopatologiju, itd. kako je naznačeno u Vodiču |  | 5 mužjaka i 5 ženki**XVI** | 10 mužjaka**XVI** 10 ženki **XVI** | 20 mužjaka**XVI** 20 ženki **XVI** |
| Dodatna posmatranja, kada je odgovarajuće | 5 mužjaka i 5 ženki |  |  |  |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVI** Uključuje pet životinja odabranih za funkcionalna ispitivanja i detaljno kliničko posmatranje kao deo studije neurotoksičnosti.

Tabela 2: Frekvenca kliničkog posmatranja i funkcionalnih ispitivanja

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vrsta posmatranja | | Trajanje studije | | | |
| Akutno | 28-dana | 90-dana | Hronično |
| Kod svih životinja | Opšte zdravstveno stanje | dnevno | dnevno | dnevno | dnevno |
| Mortalitet /morbiditet | Dva puta dnevno | Dva puta dnevno | Dva puta dnevno | Dva puta dnevno |
| Kod životinja odabranih za funkcionalna posmatranja | Detaljna klinička posmatranja | - pre prvog izlaganja - 8 sati posle doziranja u očekivano vreme najvećeg efekta - na dan 7 i 14 posle doziranja | - pre prvog izlaganja - posle toga jednom nedeljno | - pre prvog izlaganja - jednom za vreme prve ili druge nedelje izlaganja - posle toga mesečno | - pre prvog izlaganja - jednom na kraju prvog meseca izlaganja - posle toga svaka tri meseca |
| Funkcionalna ispitivanja | - pre prvog izlaganja - 8 sati posle doziranja u očekivano vreme najvećeg efekta - na dan 7 i 14 posle doziranja | - pre prvog izlaganja - za vreme četvrte nedelje tretmana što je moguće bliže kraju perioda izlaganja | - pre prvog izlaganja - jednom za vreme prve ili druge nedelje izlaganja - posle toga mesečno | - pre prvog izlaganja - jednom na kraju prvog meseca izlaganja - posle toga svaka tri meseca |

**B.44. APSORPCIJA PREKO KOŽE: *IN VIVO* METODA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 427 (2004).

*1.1. UVOD*

Ekspozicija mnogim hemikalijama se dešava uglavnom putem kože dok se većina studija izvodi na laboratorijskim životinjama peroralnom primenom. *In vivo* ispitivanje perkutane apsorpcije navedeno u ovoj smernici obezbeđuje vezu koja je neophodna za ekstrapolaciju iz studija oralne toksičnosti kada se radi procena bezbednosti posle dermalne ekspozicije.

Supstanca prolazi veliki broj slojeva ćelija kože pre nego što dospe u cirkulaciju. Za većinu supstanci sloj koji ograničava brzinu prolaza kroz kožu je stratum corneum koji se sastoji od mrtvih ćelija. Permeabilnost kroz kožu zavisi kako od lipofilnosti hemikalije tako i od debljine spoljašnjeg sloja epidermisa, kao i od faktora kao što su molekulska masa i koncentracija supstance. Uglavnom je koža pacova i zečeva permeabilnija od ljudske, dok je permeabilonost kože zamorčića i majmuna sličnija ljudskoj.

Metode za merenje perkutane apsorpcije mogu da se podele u dve kategorije: *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* metoda može da obezbedi dobre podatke o apsorpciji kroz kožu kod različitih vrsta.

Nedavno su razvijene *in vitro* metode. One koriste transport kroz ceo ili delimični sloj životinjske ili ljudske kože u rezervoar sa tečnošću. *In vitro* metoda se opisuje u posebnoj metodi ispitivanja**1**. Preporučuje se da se koristi OECD vodič**2** kao pomoć u izboru odgovarajuće metode ispitivanja apsorpcije kroz kožu za datu situaciju s obzirom da se u ovom vodiču nalaze detalji o pogodnosti kako *in vitro* tako i *in vivo* metoda.

*In vivo* metoda opisana u ovoj metodi omogućuje određivanje penetracije ispitivane supstance kroz kožu u sistemski odeljak. Ova tehnika se široko koristi tokom više godina**3, 4, 5, 6, 7**. Iako u mnogim slučajevima *in vitro* studije perkutane apsorpcije mogu da budu pogodne, postoje mnoge situacije u kojima samo *in vivo* studije mogu da obezbede neophodne podatke.

Prednost *in vivo* metode je da koristi fiziološki i metabolički intaktan sistem, koristi vrste uobičajene za mnoge studije toksičnosti i može da se modifikuje za primenu na drugim vrstama. Nedostaci su korišćenje živih životinja, potreba za korišćenjem radioaktivno obeleženog materijala da bi se dobili pouzdani rezultati, teškoće u određivanju rane faze apsorpcije i razlike u permeabilnosti kože vrsta koja se najčešće koristi (pacova) i kože čoveka. Životinjska koža je uglavnom permeabilnija i zbog toga na osnovu ovih ispitivanje može da se preceni apsorpcija kroz kožu čoveka**6, 8, 9**. Kausitične/korozivne supstance se ne ispituju na živim životinjama.

*1.2. DEFINICIJE*

Neapsorbovana doza predstavlja dozu koja je isprana sa površine kože posle ekspozicije i deo koji je prisutan na neokluzivnom pokrivaču, uključujući i dozu za koju je pokazano da je isparila sa kože tokom ispitivanja.

Apsorbovana doza (*in vivo*) obuhvata dozu koja se nalazi u urinu, u ispirku kaveza, fecesu, izdahnutom vazduhu (ako je mereno), krvi, tkivima (ako su sakupljana) i u lešu životinje posle uklanjanja dela kože na koju je primenjena supstanca.

Apsorbabilna doza predstavlja dozu u ili na koži posle ispiranja.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca (poželjno je da bude radioaktivno obeležena) primenjuje se na ošišanu kožu životinja u jednom ili više doznih nivoa u obliku reprezentativnih preparata u upotrebi. Ispitivani preparati se mogu ostaviti u kontaktu sa kožom određeno vreme pod odgovarajućim pokrivačem (ne-okluzivni, semi-okluzivni ili okluzivni) da bi se sprečila ingestija ispitivanog preparata. Na kraju ekspozicije pokrivač se uklanja i koža čisti odgovarajućim sredstvom za čišćenje, pokrivač i materijal za čišćenje se čuvaju za analizu, a na kožu se nanosi novi pokrivač. Životinje se smeštaju u pojedinačne metaboličke kaveze i ekskreti i izdahnuti vazduh se skupljaju za analizu, pre, tokom i posle perioda ekspozicije. Sakupljanje izdahnutog vazduha može da se izostavi ako postoji dovoljno podataka da je formiranje isparljivih radioaktivnih metabolita minimalno ili se uopšte ne javlja. Svaka studija obično uključuje nekoliko grupa životinja koje će biti izložene ispitivanom preparatu. Jedna grupa će biti lišena života na human način na kraju perioda ekspozicije. Potom će druge grupe biti lišene života na human način u planiranim intervalima**2**. Na kraju perioda sakupljanja uzoraka, ostatak životinja se lišava života, sakuplja se krv za analizu, uklanja se i čuva za analizu deo kože na koju je ispitivana supstanca primenjena, a leševi se analiziraju za svaki neizlučeni materijal. Uzorci se analiziraju na odgovarajuće načine i određuje se stepen perkutane apsorpcije**6, 8, 9**.

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Izbor životinjske vrste**

Obično se koristi pacov, ali sojevi bez dlake i vrste koje imaju brzine apsorpcije sličnije onoj kod ljudi mogu takođe da se koriste**3, 6, 7, 8, 9**. Uključuju se mlade, odrasle i zdrave životinje istog pola (obično muškog pola) uobičajenih laboratorijskih sojeva. Na početku studije odstupanje u telesnoj masi životinje ne treba da bude veće od ± 20% od prosečne mase. Na primer, mužjaci pacova od 200 g do 250 g, posebno na gornjoj polovini ovog raspona.

**1.4.2. Broj i pol životinja**

Grupa od najmanje četiri životinje istog pola koristi se za svaki ispitivani preparat i svako planirano vreme lišavanja života na human način. Svaka grupa životinja će biti lišena života na human način posle različitih vremenskih intervala, npr. na kraju perioda ekspozicije (obično 6 ili 24 sata) i u narednim prilikama (npr. 48 i 72 sata). Ako postoje podaci koji pokazuju suštinske razlike u dermalnoj toksičnosti između mužjaka i ženki, koristi se osetljiviji pol. Ako ne postoje takvi podaci, može da se koristi bilo koji od polova.

**1.4.3. Uslovi smeštaja i ishrane**

Temperatura u prostoru za čuvanje eksperimentalnih životinja je 22° C (± 3° C). Relativna vlažnost je najmanje 30% i da ne premašuje 70% osim za vreme čišćenja prostora. Ciljna vlažnost je 50% do 60%. Osvetljenje je veštačko sa periodom svetlosti od 12 sati i periodom mraka od 12 sati.

Za ishranu može da se koristi uobičajena hrana za eksperimentalne životinje, koja je slobodno dostupna životinjama uz neograničen pristup vodi za piće. Za vreme studije, a po mogućstvu i za vreme aklimatizacije, životinje se smeštaju u pojedinačne metaboličke kaveze. S obzirom da prosipanje hrane i vode mogu da kompromituju rezultate, verovatnoća za ovakve događaje se minimalizuje.

**1.4.4. Priprema životinja**

Životinje se označavaju da bi mogle da se pojedinačno identifikuju i čuvaju se u kavezima najmanje pet dana pre početka studije da bi se aklimatizovale na laboratorijske uslove.

Posle aklimatizacije i približno 24 sata pre doziranja, region ramena i leđa svake životinje se ošiša. Propustljivost oštećene kože je različita od one kod intaktne kože i zbog toga se izbegava abrazija kože. Posle šišanja i približno 24 sata pre primene ispitivane supstance na kožu (videti odeljak 1.4.7. ove metode), površina kože se obriše acetonom da bi se uklonio sebum. Dodatno pranje sapunima i vodom se ne preporučuje zbog toga što rezidue sapuna mogu da promovišu apsorpciju ispitivane supstance. Površina kože mora da bude dovoljno velika da obezbedi pouzdano izračunavanje apsorbovane količine ispitivane hemikalije po cm2 kože, poželjno je najmanje 10 cm2. Ova površina je praktična za pacove od 200 g do 250 g TM. Posle pripreme životinje se vraćaju u metaboličke kaveze.

**1.4.5. Ispitivana supstanca**

Ispitivana supstanca je entitet čije se penetracione ispituju. Idealno, ispitivana supstanca je radioaktivno obeležena.

**1.4.6. Ispitivani preparat**

Preparat ispitivane supstance (npr. čista, razblažena hemikalija ili formulisani materijal koji sadrži ispitivanu hemikaliju koja se primenjuje na kožu) je isti (ili realni surogat) kao onaj kojem će biti izloženi ljudi ili druga ciljna vrsta. Svako odstupanje od preparata u upotrebi se opravdava. Kada je neophodno, ispitivna supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Za vehikulume koji nisu voda treba poznavati apsoprcione karakteristike i moguće interakcije sa ispitivanom supstancom.

**1.4.7. Primena na kožu**

Na koži se definiše određeni deo površine za aplikaciju. Poznata količina ispitivanog preparata se ravnomerno nanosi na to mesto. Ova količina obično imitira moguću ekpoziciju kod ljudi, tipično 1 mg/cm2 do 5 mg/cm2 za čvrste ili do 10 µl/cm2 za tečnosti. Sve druge količine se opravdavaju uslovima očekivane primene, ciljevima studije ili fizičkim svojstvima ispitivanog preparata. Posle aplikacije, tretirano mesto se štiti od lizanja. Primer tipične sprave dat je na Slici 1. Obično se mesto primene zaštiti neokluzivnim pokrivačem (npr. pokrivač od permeabilne najlonske gaze). Za dužu primenu mesto primene se pokriva. U slučaju isparavanja poluisparljivih ispitivanih supstanci, dolazi do neprihvatljivog smanjenja recovery vrednosti za ispitivanu supstancu (videti odeljak 1.4.10. prvi pasus ove metode), neophodno je da se isparena supstanca uhvati filterom od medicinskog uglja koji pokriva spravu za primenu (videti Sliku 1). Važno je da ni jedna sprava ne oštećuje kožu, niti da apsorbuje, niti da reaguje sa ispitivanim preparatom. Životinje se vraćaju u pojedinačne metaboličke kaveze da bi se sakupljali ekskreti.

**1.4.8. Trajanje ekspozicije i uzorkovanje**

Trajanje ekspozicije je vremenski interval između primene i uklanjanja pranjem ispitivanog preparata sa kože. Koristi se odgovarajući period ekspozicije (obično 6 ili 24 sata), što se zasniva na očekivanoj dužini ekspozicije kod ljudi. Posle perioda ekspozicije, životinje se zadržavaju u metaboličkim kavezima sve do unapred planiranog lišavanja života na human način. Životinje se posmatraju u redovnim intervalima tokom studije da bi se utvrdili znaci toksičnih/abnormalnih odgovora. Na kraju perioda ekspozicije, tretirana koža se pregleda da bi se proverilo da li postoje vidljivi znaci iritacije.

Metabolički kavezi omogućavaju odvojeno sakupljanje urina i fecesa tokom studije. Oni obezbeđuju i sakupljanje 14C-ugljendioksida i isparljivih 14C- ugljenikovih jedinjenja koja se analiziraju kada su proizvedena u dovoljnoj količini (više od 5%). Urin, feces i tečnost za hvatanje (npr. 14C- ugljendioksida i isparljivih 14C-ugljenikovih jedinjenja) se pojedinačno sakupljaju od svake grupe u svako vreme uzimanja uzoraka. Ako postoji dovoljno podataka da se formira malo ili nimalo isparljivog, radioaktivnog metabolita, mogu da se koriste otvoreni kavezi.

Ekskreti se sakupljaju za vreme perioda ekspozicije i do 24 sata posle inicijalnog kontakta sa kožom, a potom svakodnevno do kraja ispitivanja. Mada su tri intervala sakupljanja ekskreta obično dovoljna, predviđena namena ispitivanog preparata ili postojeći kinetički podaci mogu da ukažu na to da je za studiju pogodnije da se uključi dodatno vreme i intervali.

Na kraju perioda ekspozicije, zaštitna naprava se uklanja sa svake životinje i odvojeno zadržava za analizu. Tretirana koža svih životinja se pere najmanje tri puta odgovarajućim sredstvom za čišćenje koristeći pogodne ubruse. To se čini pažljivo da bi se izbegla kontaminacija drugih delova tela životinje. Sredstvo za čišćenje je deo uobičajene higijenske prakse, npr. vodeni rastvor sapuna. Na kraju se koža suši. Svi ubrusi i ispirci se čuvaju za analizu. Pre vraćanja u kaveze, primenjuje se nov pokrivač da bi se zaštitilo tretirano mesto kod životinja koje su predviđene za kasnije ispitivanje.

**1.4.9. Postupci lišavanja života na human način**

Za svaku grupu, pojedinačne životinje se lišavaju života na human način u predviđeno vreme i krv se sakuplja za analizu. Zaštitna naprava ili pokrivač se uklanjaju za analizu. Koža sa mesta aplikacije i sličnog dela nedozirane, ošišane kože se uklanja od svake životinje za odvojenu analizu. Mesto primene može da se razdeli da bi se odvojio stratum corneum od epidermisa kako bi se dobio podatak o dispoziciji ispitivane hemikalije. Određivanje ove raspodele tokom vremena, posle perioda ekspozicije ukazuje na sudbinu ispitivane hemikalije u stratum cornerumu. Da bi se olakšalo razdeljivanje kože (posle završenog pranja kože i lišavanja života na human način), svi zaštitni pokrivači se uklanjaju. Koža mesta aplikacije sa prstenom okolne kože se odvaja od pacova i pričvršćuje iglama za podlogu. Parče adhezivne trake se primenjuje na površinu kože uz blagi pritisak, a potom se traka uklanja zajedno sa delom stratum corneuma. Zatim se primenjuju novi komadi adhezivne trake sve dok se traka više ne lepi za površinu kože, kada je sav stratum corneum uklonjen. Za svaku životinju svi delovi adhezivne trake mogu da se čuvaju u jednom kontejneru kome je dodat tkivni digestant da bi se solubilizovao stratum corneum. Sva potencijalno ciljna tkiva mogu da se uklone za posebna merenja pre nego što se ostaci analiziraju za apsorbovanu lešnu dozu. Leševi pojedinačnih životinja se čuvaju za analizu. Obično je dovoljna analiza ukupnog sadržaja. Ciljni organi mogu da se uklone za odvojene analize (ako su na to ukazale druge studije). Urin koji se nalazi u mokraćnoj bešici pri lišavanju života na human način, dodaje se u prethodno sakupljen urin. Posle skupljanja ekskreta iz metaboličkih kaveza u vreme lišavanja životinja života na human način, kavezi i uređaji za sakupljanje se peru odgovarajućim rastvaračem. Drugi delovi opreme koji mogu biti kontaminirani takođe se analiziraju.

**1.4.10. Analize**

U svim studijama treba postići odgovarajuću recovery vrednost (npr. srednju vrednost od 100% ± 10% radiaoktivnosti). Recovery vrednosti van ovih se opravdavaju. Količina primenjene doze u svakom uzorku se alizira odgovarajućim validovanim postupcima.

Statistička razmatranja uključuju meru varijacije za ponavljanja za svaku primenu.

**2. PODACI**

Sledeća merenja se vrše za svaku životinju, za svako vreme uzorkovanja, za ispitanu hemikaliju i/ili metabolite (uz pojedinačne podatke, podaci grupisani prema vremenu uzorkovanja prikazuju se kao srednje vrednosti):

- količina udružena sa zaštitnim napravama;

- količina koja može da se ukloni sa kože;

- količina u/na koži koja ne može da se ispere sa kože;

- količina u uzorcima krvi;

- količina u ekskretima i izdahnutom vazduhu (ako je primenljivo);

- količina koja ostane u lešu ili u organima koji su uklonjeni za odvojenu analizu.

Količina ispitivane supstance i/ili metabolita u ekskretima, izdahnutom vazduhu, krvi i lešu omogućava određivanje ukupne apsorbovane količine u svakoj vremenskoj instanci. Može se izračunati i količina ispitivane hemikalije koja je apsorbovana po cm2 izložene kože za vreme perioda ekspozicije.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži zahteve predviđene u protokolu, uključujući opravdanost sistema za ispitivanje koji je korišćen, a sadrži i podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- podaci za identifikaciju (npr. CAS broj ako je dostupan, izvor, čistoća (radiohemijska čistoća), poznate nečistoće, broj serije);

- fizička svojstva, fizička i hemijska svojstva (npr. pH, isparljivost, rastvorljivost, stabilnost, molekulska masa i log Pow).

2) Ispitivanom preparatu:

- formulacija i opravdanost primene;

- detalji o ispitivanom preparatu, primenjena količina, postignuta koncentracija, vehikulum, stabilnost i homogenost.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;

- izvor životinja, smeštaj, ishrana i itd.;

- Individualne telesne mase životinja na početku testa.

4) Uslovima ispitivanja:

- detalji primene ispitivanog preparata (mesto primene, analitičke metode, okluzija/neokluzija, zapremina, ekstrakcija, detekcija);

- detalji o kvalitetu hrane i vode.

5) Rezultatima:

- svi znaci toksičnosti;

- tabelarni podaci o apsorpciji (izraženi kao brzina, količina ili procenat);

- ukupni recovery u eksperimentu;

- tumačenje rezultata, poređenje sa raspoloživim rezultatima perkutane apsorpcije ispitivanog jedinjenja.

6) Obrazloženju rezultata.

7) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No 20.

4. Zendzian R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5), p. 829-835.

5. Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

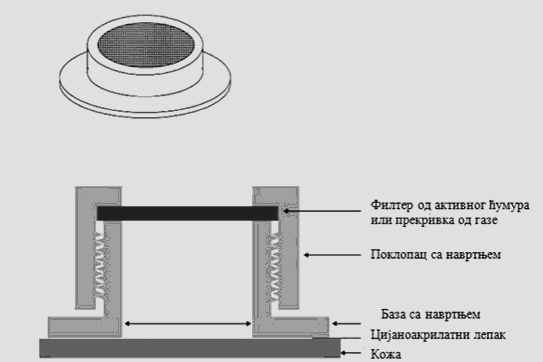
6. EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

8. Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, p. 369-373.

9. Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54, p. 399-404.

Slika 1: Primer dizajna tipične naprave koja se koristi da odredi i zaštiti mesto dermalne primene za vreme *in vivo* studija perkutane apsorpcije.



**B.45. APSORPCIJA PREKO KOŽE: *IN VITRO* METODA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 428 (2004).

*1.1. UVOD*

Ova metoda je namenjena da obezbedi podatke o apsorpciji ispitivane supstance koja je primenjena na odsečak kože. Ona može da se kombinuje sa *in vivo* metodom za apsorpciju kroz kožu**1** ili da se izvodi odvojeno. Preporučuje se da se koristi OECD vodič za izvođenje ispitivanja apsorpcije kroz kožu**2** kao pomoć u dizajniranju studije zasnovane na ovoj metodi. Vodič je pripremljen da olakša izbor odgovarajućih *in vitro* postupaka za korišćenje u specifičnim okolnostima, da bi se obezbedila pouzdanost rezultata dobijenih ovom metodom.

Metode za merenje apsorpcije kroz kožu i dermalnog transporta mogu da se podele u dve kategorije: *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* metode mogu da obezbede dobar farmakokinetički podatak o apsorpciji kroz kožu kod različitih vrsta životinja. *In vivo* metoda je opisana u posebnoj metodi**1**. *In vitro* metode se godinama koriste za merenje apsorpcije kroz kožu. Mada formalne validacione studije *in vitro* metoda koje se nalaze u ovoj metodi ispitivanja nisu izvedene, OECD eksperti su se složili 1999 godine da postoji dovoljno evaluiranih podataka koji opravdavaju *in vitro* metodu**3**. Dalji podaci koji potvrđuju ovo, uključujući i značajan broj poređenja *in vivo* i *in vitro* metoda navedeni su u vodiču**2**. Postoje brojne monografije koje razmatraju ovu temu i obezbeđuju detaljnu pozadinu primene *in vitro* metode**4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12**. *In vitro* metode mere difuziju hemikalija u i kroz kožu do rezervoara tečnosti i mogu da koriste neživu kožu za merenje difuzije ili svežu, metabolički aktivnu kožu za istovremeno merenje difuzije i metabolizma kože. Ove metode su posebno pogodne kao skrining za poređenje transporta hemikalija u i kroz kožu iz različitih formulacija i mogu da obezbede korisne modele za procenu perkutane apsorpcije kod ljudi.

*In vitro* metoda nije primenjiva u svim situacijama i za sve klase hemikalija. Moguće je koristiti *in vitro* metodu ispitivanja za inicijalnu kvalitativnu evaluaciju penetracije kroz kožu. U određenim slučajevima može biti neophodno da se ovo isprati podacima dobijenim u *in vivo* ispitivanjima. Pogledati vodič**2** za razjašnjenje situacija u kojima bi *in vitro* metoda bila pogodna. Dodatni detaljni podaci obezbeđeni su u literaturi**3**.

Ova metoda prikazuje opšte principe za merenje dermalne apsorpcije i transporta ispitivane supstance uz upotrebu isečka kože. Može da se koristi koža mnogih vrsta sisara uključujući i ljudsku. Karakteristika permeabilnosti kože se zadržava i posle isecanja zato što je glavna difuziona barijera mrtvi stratum corneum, a aktivni transport hemikalija kroz kožu nije do sada identifikovan. Za kožu je pokazano da može da metaboliše neke hemikalije tokom perkutane apsorpcije6, ali ovaj proces nije ograničavajući u smislu apsorbovane doze, mada može da utiče na prirodu materijala koji ulazi u cirkulaciju.

*1.2. DEFINICIJE*

Neapsorbovana doza jeste doza koja je isprana sa površine kože posle ekspozicije i deo koji je prisutan na neokluzivnom pokrivaču, uključujući i dozu za koju je pokazano da je isparila sa kože tokom ekspozicije.

Apsorbovana doza (*in vivo*) jeste količina ispitivane supstance koja je dospela u prijemnu tečnost ili sistemsku cirkulaciju tokom navedenog vremenskog perioda.

Apsorbabilna doza jeste doza na ili u koži posle ispiranja.

*1.3. PRINCIP METODE*

Ispitivana supstanca, najbolje radioaktivno obeležena, primenjuje se na površinu uzorka kože koja razdvaja dve komore difuzione ćelije. Hemikalija ostaje na koži određeno vreme sa kožom pod određenim uslovima, pre uklanjanja odgovarajućim postupkom čišćenja. Uzorci prijemne tečnosti se uzimaju u određenim vremenskim instancama tokom eksperimenta i analiziraju se na ispitivanu hemikaliju i/ili metabolite.

Kada se koriste metabolički aktivni sistemi, mogu da se analiziraju metaboliti ispitivane hemikalije pomoću odgovarajućih metoda. Na kraju eksperimenta kvantifikuje se distribucija ispitivane hemikalije i njenih metabolita kada to odgovara.

Koristeći odgovarajuće uslove, koji su opisani u ovoj metodi i u vodiču**2**, apsorpcija ispitivane supstance tokom datog perioda se meri analizom prijemne tečnosti i tretirane kože. Ispitivana supstanca koja ostaje u koži smatra se apsorbovanom, osim ako može da se pokaže da apsorpcija može da se odredi samo iz vrednosti u prijemnoj tečnosti. Analiza drugih komponenti (materijal ispran sa kože i onaj koji je ostao u slojevima kože) omogućuje dalju evaluaciju podataka, uključujući ukupnu dispoziciju supstance i recovery u procentima.

Da bi pokazali mogućnosti i pouzdanost test sistema u laboratoriji u kojoj se izvodi ispitivanje, rezultati za relevantne referentne hemikalije treba da budu dostupni i da budu u skladu sa podacima datim u literaturi za metodu koja se koristi. Ovaj zahtev može da se ispuni ispitivanjem odgovarajuće referentne supstance (poželjno je da lipofilnost bude bliska lipofilnosti ispitivane supstance), istovremeno sa ispitivanom supstancom ili obezbeđivanjem odgovarajućih istorijskih podataka o većem broju referntnih supstanci različite lipofilnosti (nrp. kofein, benzoeva kiselina i testosteron).

*1.4. OPIS METODE*

**1.4.1. Difuziona ćelija**

Difuziona ćelija se sastoji od donorske komore i prijemne komore između kojih se postavlja koža (primer tipičnog dizajna je dat na Slici 1). Ćelije treba da obezbede dobro zaptivanje oko kože, omoguće jednostavno uzorkovanje i dobro mešanje prijemnog rastvora u kontaktu sa donjom stranom kože kao i dobru kontrolu temperature ćelije i njenog sadržaja. Statične i protočne difuzione ćelije su jednako prihvatljive.

Obično se donorske ćelije ostavljaju neokludirana za vreme ekspozicije određenoj dozi ispitivanog preparata. Za neodređene aplikacije i pojedina scenarija za određene doze, donorske komore mogu da se okludiraju.

**1.4.2. Prijemna tečnost**

Preporučuje se korišćenje fiziološki pogodne prijemne tečnosti, mada mogu da se koriste i druge ako je to opravdano. Navodi se precizni sastav prijemne tečnosti. Pokazuje se odgovarajuća rastvorljivost ispitivane hemikalije u prijemnoj tečnosti tako da tečnost ne predstavlja barijeru za apsorpciju. Uz to, prijemna tečnost ne treba da utiče na integritet preparata kože. U protočnom sistemu brzina protoka ne sme da utiče na difuziju ispitivane supstance u prijemnu tečnost. U statičnom ćelijskom sistemu, prijemna tečnost se neprekidno meša i redovno uzorkuje. Ako se ispituje metabolizam, prijemna tečnost obezbeđuje da koža ostane živa tokom celokupnog eksperimenta.

**1.4.3. Preparati kože**

Može da se koristi koža ljudi ili životinja. Poznato je da je korišćenje ljudske kože predmet domaćih i međunarodnih etičkih razmatranja i uslovljavanja. Mada je živa koža bolja, neživa koža može da se koristi ako može da se pokaže integritet kože. Prihvatljive su epidermalne membrane (enzimski, toplotno ili hemijski odvojene), ili odvojeni slojevi kože (obično debljine 200-400 µm) pripremljeni sa dermatomom. Puna debljina kože može da se koristi ali prekomerna debljina (približno više od 1 mm) se izbegava osim u slučaju specifičnog zahteva da se odredi ispitivana hemikalija u slojevima kože. Izbor vrste, anatomskog mesta i tehnika pripreme se opravdava. Potrebni su prihvatljivi podaci od najmanje četiri ponavljanja po ispitivanom preparatu.

**1.4.4. Integritet preparata kože**

Suštinsko je da se koža dobro pripremi. Neodgovarajuće rukovanje može da ima za posledicu oštećenje stratus corneuma i zbog toga integritet pripremljene kože se proverava. Kada se ispituje metabolizam kože, svež isečak kože se koristi što je pre moguće u uslovima za koje se zna da održavaju metabolizam kože. Kao opšte pravilo, svež isečak kože se koristi u okviru 24 sata, ali prihvatljiv period čuvanja može da varira zavisno od enzimskog sistema koji je uključen u metabolizam i temperature čuvanja**13**. Kada se preparati kože čuvaju pre upotrebe, mora da postoji dokaz da je funkcija barijere očuvana.

**1.4.5. Ispitivana supstanca**

Ispitivana supstanca je entitet čije se penetracione karakteristike ispituju. Idealno, ispitivana supstanca je radioaktivno obeležena.

**1.4.6. Ispitivani preparat**

Preparat ispitivane supstance (npr. čista, razblažena ili formulisani materijal koji sadrži ispitivanu hemikaliju koja se primenjuje na kožu), je jednak (ili realna zamena) kao onaj kojem će biti eksponirani ljudi ili druga moguća ciljna vrsta. Svaka varijacija od preparata u upotrebi se opravdava.

**1.4.7. Koncentracije ispitivane supstance i formulacije**

Obično se više od jedne koncentracije ispitivane supstance koristi odražavajući gornju ili potencijalnu ekspoziciju ljudi. Razmatra se ispitivanje različitih tipičnih formulacija.

**1.4.8. Primena na kožu**

U uobičajenim uslovima ljudske ekspozicije hemikalijama sreću se određene doze. Količina koja se primenjuje imitira moguću ekspoziciju kod ljudi, tipično 1 mg/cm2 do 5 mg/cm2 kože za čvrste ili 10 µl/cm2 za tečnosti.

Količine se opravdavaju očekivanim uslovima primene, ciljevima studije ili fizičkim svojstvima ispitivanog preparata. Na primer, primene na površinu kože mogu biti neodređene u slučajevima gde se nanose velike zapremine po jedinici površine.

**1.4.9. Temperatura**

Na pasivnu difuziju hemikalija (i apsorpciju kroz kožu) utiče temperatura. Difuziona komora i koža se održavaju na konstantnoj temperaturi koja je bliska temperaturi kože od 32° C ± 1° C. Različiti dizajn ćelija ima različite uslove vodenog kupatila ili temperaturnog bloka za obezbeđivanje održavanja temperature prijemnika i kože u fiziološkim granicama. Vlažnost je između 30% i 70%.

**1.4.10. Trajanje ekspozicije i uzorkovanje**

Ekspozicija kože ispitivanom preparatu može biti tokom celokupnog eksperimenta ili kraćeg perioda (tj. da bi se imitirala specifična vrsta ekspozicije ljudi). Koža se ispere od viška ispitivanog preparata odgovarajućim sredstvom za čišćenje, a ispirak se sakupi za analizu. Postupak uklanjanja ispitivanog preparata zavisi od očekivanog uslova kod primene i opravdava se. Period uzorkovanja od 24 sata je uobičajen da bi se obezbedila adekvatna karakterizacija profila apsorpcije. S obzirom da se integritet kože posle 24 sata narušava, vremena uzorkovanja ne treba da budu duža od 24 sata. Za ispitivane supstance koje prodiru u kožu brzo, ovo možda nije neophodno, ali za supstance koje prodiru sporo može da bude potrebno duže vreme. Učestalost uzimanja uzoraka prijemne tečnosti obezbeđuje grafičko prikazivanje apsorpcionog profila ispitivane supstance.

**1.4.11. Završni postupci**

Svi delovi ispitivanog sistema se analiziraju i određuje se recovery. Ovo uključuje donorsku komoru, ispirak površine kože, preparat kože i prijemnu tečnost/komoru. U nekim slučajevima koža može da se razdvoji na izloženi deo i deo kože ispod ćelijskog oboda i na stratum corneum, epidermis i dermis radi zasebnih analiza.

**1.4.12. Analiza**

U svim studijama treba postići odgovarajući recovery (npr. 100% ± 10% radiaoktivnosti i svako odstupanje se opravdava). Količina ispitivane supstance u prijemnoj tečnosti, preparatu kože, ispicima površine kože i ispirak aparature se analiziraju korišćenjem odgovarajuće tehnike.

**2. PODACI**

Navode se: analiza prijemne tečnosti, distribucija ispitivane hemikalije u test sistemu i apsorpcioni profil u vremenu. Kada se koriste uslovi određene doze, izračunava se: količina isprana sa kože, količina združena sa kožom (i u različitim slojevima kože, ako se analizira) i količina prisutna u prijemnoj tečnosti (brzina, i količina ili procenat od primenjene doze). Apsorpcija kroz kožu može ponekad da se izrazi korišćenjem podataka dobijenih samo analizom prijemne tečnosti. Kada ispitivana supstanca ostane u koži na kraju studije, može da bude potrebno da se ta količina uključi u ukupnu apsorbovanu količinu (videti literaturu**3**). Kada se u ekspoziciji koriste uslovi neodređene doze, podaci će omogućiti izračunavanje konstante permeabilnosti (u daljem tekstu: Kp). Pod ovim uslovima, procenat koji je apsorbovan nije relevantan.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži zahteve navedene u protokolu uključujući opravdanost sistema za testiranje koji je korišćen, a sadrži i podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, fizička i hemijska svojstva (najmanje molekulska masa i log Pow), čistoća (radiohemijska čistoća);

- podaci o identifikaciji (npr. broj serije);

- rastvorljivost u prijemnoj tečnosti.

2) Ispitivanom preparatu:

- formulacija i opravdanost primene;

- homogenost.

3) Uslovima ispitivanja:

- izvori i predeo kože, metod pripreme, uslovi čuvanja pre upotrebe, pretretman (čišćenje, tretman antibioticima, itd.), merenja integriteta kože, metabolički status, opravdanost upotrebe;

- dizajn ćelije, sastav prijemne tečnosti, brzina protoka prijemne tečnosti ili vremena uzorkovanja i postupci;

- detalji primene ispitivanog preparata i kvantifikacija primenjene doze;

- trajanje ekspozicije;

- detalji uklanjanja ispitivanog preparata sa kože, tj. ispiranje kože;

- detalji analize kože i tehnika frakcionisanja koje su korišćene da pokažu distribuciju u koži;

- postupci za pranje ćelija i opreme;

- metode za analizu, tehnike ekstrakcije, limiti detekcije i validacija analitičke metode.

4) Rezultatima:

- ukupan recovery eksperimenta (primenjena doza = ispirci kože + koža + prijemna tečnost + ispirci ćelija);

- tabeliranje individualnih recovery vrednosti ćelija za svaki kompartman;

- apsorpcioni profil;

- tabelirani podaci o apsorpciji (izraženi kao brzina, količina ili procenat).

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2. OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.

6. Bronaugh R.L. and Maibach H.I., (1991) *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W., (1999) Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

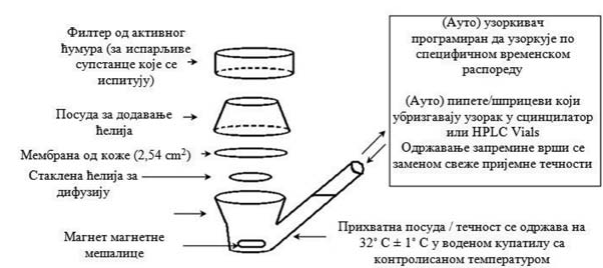
9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

10. Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

11. Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel. (12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Slika 1: Primer tipičnog dizajna stičke difuzione ćelije za *in vitro* studije perkutane apsorpcije.



**V.46. *IN VITRO* IRITACIJA KOŽE: ISPITIVANJE NA MODELU REKONSTRUISANOG HUMANOG EPIDERMA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Iritacija kože jeste izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primene ispitivane supstance u trajanju do najviše 4 sata (prema definiciji datoj u Globalno harmonizovanom sistemu za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija (u daljem tekstu: GHS) Ujedinjenih nacija (u daljem tekstu: UN), u daljem tekstu: UN GHS)**1**. Ova metoda ispitivanja predviđa *in vitro* postupak koji u zavisnosti od zahtevanih podataka omogućava da se iritativno delovanje supstanci na kožu odredi nezavisnom zamenom za ispitivanje u okviru strategije ispitivanja, u skladu sa pristupom procene kvaliteta podataka**2**.

Procena iritacije kože do sada je uglavnom zahtevala korišćenje laboratorijskih životinja (videti metodu ispitivanja V.4. koja je data u ovom pravilniku)**3**. Vodeći računa o dobrobiti životinja metoda ispitivanja V.4. omogućava da se kod određivanja korozivnosti/iritacije kože primeni strategija višestepenog ispitivanja i koriste validirane metode *in vitro* i *ex vivo*, kako bi se izbegli bol i patnja životinja. Za ispitivanje korozivnosti u okviru strategije višestepenog ispitivanja iz metode V.4. korisne su tri validirane in vitro metode ispitivanja, odnosno smernice - V.40. *in vitro* ispitivanje korozivnog oštećenja kože: ispitivanje transkutanog električnog otpora (TER), V.40.bis. *in vitro* korozivno oštećenje kože: ispitivanje na modelu humane kože i metoda OECD: 435**4,5,6**.

Ova metoda ispitivanja zasniva se na modelima rekonstruisanog humanog epiderma koji u potpunosti (korišćenje keratinocita iz humanog epiderma kao izvora ćelija, reprezentativnog tkiva i citoarhitektura) imaju veoma slična biohemijska i fiziološka svojstva kao gornji delovi humane kože tj. epiderma. Postupak opisan u okviru ove metode ispitivanja omogućava da se utvrdi opasnost od iritativnih supstanci u skladu sa kategorijom 2 UN GHS.

Ova metoda ispitivanja obuhvata i niz referentnih standarda koji se koriste za procenu sličnih i modifikovanih metoda ispitivanja na osnovu rekonstruisanog humanog epiderma**7**.

Za dve *in vitro* metode ispitivanja**8,9,10,11,12,13,14,15,16,17** u kojima se koriste modeli rekonstruisanog humanog epiderma, koji su dostupni na tržištu kao EpiSkinTM i EpiDermTM, završene su studije predvalidacije, optimizacije i validacije. Gore pomenuta literatura zasniva se na obeležavanju R 38. Za potrebe GHS obrađeni su i određeni aspekti preračunavanja**25**. Metode čije karakteristike odgovaraju metodi ispitivanja EpiSkinTM (validirana referentna metoda 1) preporučuju se kao nezavisna zamena za ispitivanje za *in vivo* ispitivanje na kunićima za potrebe klasifikacije iritativnih supstanci u kategoriju 2 GHS. Metode čije su karakteristike jednake sa metodom EpiDermTM (validirana referentna metoda 2), u odnosu na klasifikaciju iritativnih supstanci u kategoriju 2 GHS preporučuju se samo kao skrining test ili kao deo strategije višestepenog ispitivanja u okviru pristupa procene kvaliteta podataka. Da bi se predloženo *in vitro* ispitivanje iritacije kože na modelu rekonstruisanog humanog epiderma moglo koristiti u svrhu sprovođenja propisa, potrebno je odrediti njegovu pouzdanost, relevantnost (tačnost) i ograničenja u odnosu na predloženi način korišćenja i uporediti ga sa validiranom referentnom metodom 1, u skladu sa standardima izvođenja utvrđenim u ovoj metodi ispitivanja (videti Dodatak koji je dat u ovoj metodi).

Još dve *in vitro* metode ispitivanja na modelu rekonstruisanog humanog epiderma validirana su u skladu sa zahtevima ove metode ispitivanja i daju slične rezultate kao validirana referentna metoda 1**18**. To su modifikovane metode ispitivanja EpiDermTM (varijanta referentne metode 2) i metode ispitivanja SkinEthic RHETM ("me-too" metoda 1).

*1.2. DEFINICIJE*

Pojedini izrazi upotrebljeni u ovoj metodi ispitivanja imaju sledeće značenje:

Tačnost jeste stepen ujednačenosti između rezultata metode ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrednosti. Ona je merilo radnih karakteristika metode ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Ovaj termin se često koristi u istom značenju kao termin "usklađenost" kako bi se označio udeo tačnih rezultata metode ispitivanja.

Supstanca za kontrolu lota jeste referentna supstanca kod koje ćelije tkiva pokazuju srednji stepen vijabilnosti.

Vijabilnost ćelija jeste parametar za merenje ukupne aktivnosti populacije ćelija, npr. sposobnost ćelijskih mitohondrijalnih dehidrogenaza da redukuju vitalnu boju MTT (3 - (4,5 - dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - difeniltetrazolijum bromid, tiazolil plavo;), koji je, u zavisnosti od efekta koji se meri i postavke ispitivanja, u korelaciji sa ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih ćelija.

ET50 jeste vreme izlaganja u kojem se vijabilnost ćelija smanjuje za 50% nakon primene marker supstance u unapred određenoj fiksnoj koncentraciji, videti takođe IC50.

Udeo lažno negativnih jeste udeo svih pozitivnih supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao negativne. Ona je jedan od pokazatelja radnih karakteristika metode ispitivanja.

Udeo lažno pozitivnih jeste udeo svih negativnih (neaktivnih) supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao pozitivne. Ona je jedan od pokazatelja radnih karakteristika metode ispitivanja.

Beskonačna doza jeste količina ispitivane supstance nanesena na kožu koja prelazi količinu koja je potrebna da se potpuno i ravnomerno prekrije površina kože.

Globalno harmonizovani sistem za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija (u daljem tekstu: GHS) jeste sistem koji predlaže klasifikaciju hemikalija (supstanci i smeša) prema standardizovanim vrstama i nivoima fizičkih opasnosti i opasnosti po zdravlje ljudi i životnu sredinu, koji obuhvata i odgovarajuće elemente komunikacije kao što su piktogrami, reči upozorenja, obaveštenja o opasnosti, obaveštenja o merama predostrožnosti i bezbednosni listovi, da bi se prenela informacija o njihovim štetnim efektima sa ciljem da se zaštiti zdravlje ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prevoznike, potrošače i pružaoce pomoći u vanrednim situacijama) i životna sredina**1**, a koji je transponovan u domaće zakonodavstvo pravilnikom kojim se uređuju klasifikacija, pakovanje i obeležavanje hemikalija u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN.

IC50 jeste koncentracija pri kojoj marker supstanca smanjuje vijabilnost tkiva za 50% (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja, videti takođe ET50.

Standardi izvođenja jesu standardi na osnovu validirane referentne metode koji čine osnovu za ocenjivanje uporedivosti predložene metode ispitivanja koja je po mehanizmu i funkcionalno slična proverenoj referentnoj metodi. Oni obuhvataju: 1) važne elemente metode ispitivanja, 2) minimalni spisak referentnih supstanci izabranih među supstancama koje su korišćene za dokazivanje prihvatljivih karakteristika validirane referentne metode i 3) uporedive nivoe tačnosti i pouzdanosti koje pokazuje predložena metoda ispitivanja kod ocenjivanja primenom minimalnog spiska referentnih supstanci u odnosu na validiranu referentnu metodu.

Pouzdanost pokazuje u kojoj meri metoda ispitivanja može ponovo da se primeni unutar jedne laboratorije i između više laboratorija u određenom vremenu uz primenu iste procedure. Ona se ocenjuje izračunavanjem ponovljivosti unutar jedne laboratorije i između više laboratorija.

Osetljivost jeste udeo svih pozitivnih/aktivnih supstanci koje su pravilno klasifikovane primenom ispitivanja. To je mera tačnosti metode ispitivanja koja daje precizne rezultate po kategorijama i predstavlja važan faktor za ocenu relevantnosti metode ispitivanja.

Specifičnost jeste udeo svih negativnih/neaktivnih supstanci koje su pravilno klasifikovane primenom ispitivanja. To je mera tačnosti metode ispitivanja koja daje precizne rezultate i predstavlja važan faktor za ocenu relevantnosti metode ispitivanja.

Iritacija kože predstavlja nastanak reverzibilnog oštećenja kože nakon primene ispitivane supstance u trajanju do najviše 4 sata. Iritacija kože je lokalna neimunogena reakcija koja se javlja ubrzo nakon stimulacije**24**. Njena glavna karakteristika je reverzibilan proces koji uključuje inflamatorne reakcije i većinu karakterističnih kliničkih znakova iritacije (eritem, edem, svrab i bol) koji se povezuju sa upalnim procesom.

*1.3. PODRUČJE PRIMENE I OGRANIČENJA*

Ograničenje ispitivanja sa rekonstruisanim humanim epidermom u skladu sa ovom metodom ispitivanja sastoji se u tome što se pomoću njih supstance mogu klasifikovati samo u kategoriju 2 iritacija kože u okviru sistema UN GHS. Budući da ova ispitivanja ne omogućavaju klasifikaciju supstanci u moguću kategoriju 3 prema definiciji UN GHS, sve ostale supstance će ostati neklasifikovane (izvan kategorije). Ova metoda ispitivanja se revidira u zavisnosti od propisanih zahteva i mogućeg uključivanja novih efekata, poboljšanja ili razvoja novih alternativnih "me-too" ispitivanja.

Ova metoda ispitivanja omogućava da se utvrdi opasnost monokonstituentnih iritativnih supstanci**19**, ali ne pruža odgovarajuće informacije o iritaciji kože. Gasovi i aerosoli ne mogu se ispitivati, a smeše još nisu procenjene u studiji validacije.

*1.4. PRINCIP ISPITIVANJA*

Ispitivana supstanca se topikalno nanosi na trodimenzionalni model rekonstruisanog humanog epiderma, koji čine obični humani epidermalni keratinociti uzgojeni radi dobijanja visoko izdiferenciranog modela humanog epiderma. Sastoji se od organizovanih bazalnih, nazubljenih i zrnastih slojeva i višeslojnog rožnatog sloja (stratum corneum) koji sadrži međućelijske lamelarne masne slojeve raspoređene analogno obrascu koji se nalazi *in vivo*.

Princip ispitivanja na modelu rekonstruisanog humanog epiderma zasniva se na pretpostavci da iritativne supstance mogu da difuzijom prodru u rožnati sloj i da su citotoksične za ćelije u nižim slojevima. Vijabilnost ćelija meri se pretvaranjem vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, tiazolil plava; EINECS broj 206-069-5, CAS broj 298-93-1)] u plavu so formazana delovanjem dehidrogenaze, koja se kvantitativno meri nakon ekstrakcije iz tkiva**20**. Iritativne supstance prepoznaju se po tome što snižavaju vijabilnost ćelija ispod definisanih pragova (tj. £ 50% za kategoriju 2 iritativnih supstanci UN GHS). Supstance koje prouzrokuju vijabilnost ćelija iznad definisanog praga se ne klasifikuju (tj. > 50%, izvan kategorije).

Sistemi koji se zasnivaju na modelu rekonstruisanog humanog epiderma mogu se koristiti za ispitivanje čvrstih supstanci, tečnosti, polučvrstih supstanci i voskova. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstance mogu biti rastvorljive ili nerastvorljive u vodi. Kad god je moguće čvrste supstance se ispituju u obliku sitnog praha. Budući da je validacijom sistema ispitivanja na modelu rekonstruisanog humanog epiderma obuhvaćeno 58 pažljivo odabranih supstanci koje predstavljaju širok spektar hemijskih klasa, očekuje se da će metode biti opšte primenjljive u svim hemijskim klasama**16**. Validacijom je obuhvaćeno 13 iritativnih supstanci iz kategorije 2 u skladu sa GHS. U validaciju nisu uključene kiseline koje nisu korozivne, baze, soli i druge neorganske supstance kao i neke poznate klase organskih iritativnih supstanci, kao što su hidroperoksidi, fenoli i surfaktanti, ili su uključeni samo u ograničenoj meri.

*1.5. DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI*

Poželjno je da laboratorije pre rutinske primene validiranog metoda koji ispunjava zahteve ove metode ispitivanja dokažu tehničku osposobljenost na deset preporučenih supstanci koje su navedene u Tabeli 1. U okviru ove metode ispitivanja, opciona kategorija 3 UN GHS ne smatra se kategorijom. Da bi se nove istovetne ("me-too") metode ispitivanja razvijene iz ove metode ispitivanja, pošto su strukturno i funkcionalno slične validiranim referentnim metodama, kao i modifikovane validirane metode, mogle koristiti u ispitivanjima za ispunjavanje propisanih zahteva, potrebno je dokazati uporedivu pouzdanost i tačnost nove metode primenom referentnih standarda navedenih u Dodatku koji je dat u Delu drugom ove metode.

Tabela 1. Supstance za proveru tehničke osposobljenosti, koje predstavljaju podskup referentnih supstanci iz Dodatka koji je dat u ovoj metodi

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS broj | Skor *in vivo* | Agregatno stanje | Kategorija GHS |
| naftalen-sirćetna kiselina | 86-87-3 | 0 | čvrsto | izvan kat. |
| izopropanol | 67-63-0 | 0,3 | tečno | izvan kat. |
| metil-stearat | 112-61-8 | 1 | čvrsto | izvan kat. |
| heptil-butirat | 5870-93-9 | 1,7 | tečno | Opciona kat. 3 |
| heksil-salicilat | 6259-76-3 | 2 | tečno | Opciona kat. 3 |
| ciklamen-aldehid | 103-95-7 | 2,3 | tečno | kat. 2 |
| 1-bromheksan | 111-25-1 | 2,7 | tečno | kat. 2 |
| butil-metakrilat | 97-88-1 | 3 | tečno | kat. 2 |
| 1-metil-3-fenil-1-piperazin | 5271-27-2 | 3,3 | čvrsto | kat. 2 |
| heptanal | 111-71-7 | 4 | tečno | kat. 2 |

*1.6. OPIS METODE*

Dat je opis elemenata i postupaka u vezi sa ispitivanjem na modelu rekonstruisanog humanog epiderma za potrebe ocenjivanja iritacije kože. Model rekonstruisanog humanog epiderma može se izraditi, preparirati ili nabaviti na tržištu (npr. EpiSkinTM, EpiDermTM i SkinEthic RHETM). Standardni protokoli ispitivanja za EpiSkinTM, EpiDermTM i SkinEthic RHETM mogu se preuzeti sa interneta (http://ecvam.jrc.ec.europa.eu**21,22,23**). Ispitivanje se izvodi na sledeći način:

**1.6.1. Elementi modela rekonstruisanog humanog epiderma**

*1.6.1.1. Opšti uslovi koje ispunjava model*

Za izgradnju epitela koriste se normalni tipovi humanih keratinocita. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja *(stratum corneum)* nalaze se višestruki slojevi vitalnih epitelnih ćelija (bazalni sloj, nazubljen sloj, zrnasti sloj). Rožnati sloj je višeslojan i sadrži esencijalni profil lipida da bi proizveo čvrstu funkcionalnu barijeru sposobnu da zaustavi brzi prodor citotoksičnih marker supstanci, npr. natrijum dodecil sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkcija barijere može se oceniti određivanjem koncentracije marker supstance koja smanjuje vijabilnost tkiva za 50% (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnosti tkiva smanji za 50% (ET50) nakon primene marker supstance u unapred određenoj fiksnoj koncentraciji. Model mora biti dovoljno nepropustan da spreči prolazak materijala oko rožnatog sloja do vitalnog tkiva, jer bi to značilo loše modeliranje izlaganja kože. Model kože ne sme biti kontaminiran bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

*1.6.1.2. Funkcionalni uslovi koje ispunjava model*

1.6.1.2.1. Vijabilnost

Poželjna analiza za određivanje stepena vijabilnosti je MTT ispitivanje**20**. Optička gustina (u daljem tekstu: OD) ekstrahovane (rastvorene) boje iz tkiva obrađivanog negativnom kontrolom (u daljem tekstu: NC) je najmanje 20 puta veća od vrednosti OD samog ekstrakcionog rastvarača. Potrebno je dokumentovati da je tkivo obrađivano negativnom kontrolom stabilno u kulturi (tj. daje slična merenja vijabilnosti) za vreme trajanja ispitivanog izlaganja.

1.6.1.2.2. Funkcija barijere

Rožnati sloj i njegov sastav lipida mora biti sposoban da zaustavi brzi prodor citotoksičnih marker supstanci, npr. SDS ili Triton X-100, procenjeno na osnovu IC50 ili ET50.

1.6.1.2.3. Morfologija

Histološki pregled rekonstruisane kože/epiderma vrše osposobljena lica, pri čemu ovaj pregled dokazuje da je struktura rekonstruisane kože/epiderma slična strukturi humane kože/epiderma (uključujući višeslojni rožnati sloj).

1.6.1.2.4. Ponovljivost

Dokazuje se da su rezultati metode kod primene određenog modela ponovljivi u vremenu, po mogućnosti pomoću odgovarajuće supstance za kontrolu lota (referentne supstance) (videti Dodatak koji je dat u ovoj metodi).

1.6.1.2.5. Kontrole kvaliteta (KK) modela

Svaka serija modela epiderma ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost (odeljak 1.6.1.2.1. ove metode) i funkcija barijere (odeljak 1.6.1.2.2. ove metode). Opseg prihvatljivosti (gornja i donja granica prihvatljivosti) za IC50 odnosno ET50 određuje snabdevač modela kože (ili istraživač, ako se koristi sopstveni model). Svojstvo barijere tkiva proverava laboratorija po prijemu tkiva. Za pouzdano predviđanje iritativnih efekata prihvatljivi su isključivo rezultati dobijeni sa tkivima koja ispunjavaju zadate kriterijume. Kao primer u daljem tekstu navedeni su opsezi prihvatljivosti za validirane referentne metode.

Tabela 2. Primeri kriterijuma za odobrenje lota u okviru kontrole kvaliteta

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Donja granica prihvatljivosti | Srednja vrednost područja  prihvatljivosti | Gornja granica prihvatljivosti |
| Validirana referentna metoda 1 (18-časovna obrada SDS-om) | IC50 = 1,0 mg/ml | IC50 = 2,32 mg/ml | IC50 = 3,0 mg/ml |
| Validirana referentna metoda 2 (1% triton X-100) | ET50 = 4,8 hr | ET50 = 6,7 hr | ET50 = 8,7 hr |

*1.6.1.3. Primena ispitivanih i kontrolnih supstanci*

U svakoj obradi i kontrolama upotrebljava se dovoljan broj replika tkiva (najmanje tri po ispitivanju). Bilo da se radi o tečnostima ili o čvrstim supstancama, nanosi se dovoljna količina ispitivane supstance da površina kože bude ravnomerno prekrivena, ali pazi se da se izbegne beskonačna doza (videti odeljak 1.2. ove metode), tj. najmanje 25 μL/cm2 ili 25 mg/cm2. U slučaju čvrstih supstanci površina epiderma se pre nanošenja navlaži dejonizovanom ili destilovanom vodom kako bi se obezbedilo dobro prijanjanje uz kožu. Kad god je to moguće čvrste supstance se ispituju u obliku sitnog praha. Na kraju perioda izlaganja, ispitivana supstanca se pažljivo opere sa površine kože vodenim pufer rastvorom ili 0,9%-tnom NaCl. Zavisno od modela rekonstruisanog humanog epiderma koji se koristi, period izlaganja može biti između 15 i 60 minuta, a temperatura inkubacije između 20° C i 37° C.

U svakoj studiji se paralelno koriste negativne kontrole (u daljem tekstu: NC) i pozitivne kontrole (u daljem tekstu: PC) kako bi se dokazalo da se vijabilnost (NC), funkcija barijere i rezultujuća osetljivost tkiva (PC) kreću u okvirima opsega prihvatljivosti ranijih ispitivanja. Predlaže se da se kao PC supstanca koristi 5%-tni vodeni rastvor SDS. Predložene NC supstance su voda ili rastvor soli puferisan fosfatom (PBS).

*1.6.1.4. Merenja vijabilnosti ćelija*

Najvažniji element postupka ispitivanja je da se merenja vijabilnosti ne vrše neposredno nakon izlaganja ispitivanoj supstanci, već nakon dovoljno dugog perioda inkubacije nakon obrade tokom koje se oprana tkiva drže u svežem medijumu. Ovaj period ostavlja dovoljno vremena da se tkivo oporavi od slabih iritativnih efekata, ali i da se pojave jasni znakovi citotoksičnih efekata. U fazi opitimizacije ispitivanja**9,10,11,12,13** pokazalo se da je optimalni period inkubacije nakon obrade 42 sata i to je korišćeno i kod validacije referentnih metoda.

Test konverzije MTT je kvantitativni validirani metod za merenje vijabilnosti ćelija. Taj test odgovara za trodimenzionalni model tkiva. Uzorak kože se stavi u rastvor MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3 mg/mL - 1 mg/mL) i ostavi tri sata. Nataloženi plavi formazan se zatim ekstrahuje iz tkiva pomoću rastvarača (npr izopropanol, kiseli izopropanol) pa se koncentracija formazana izmeri određivanjem vrednosti OD na 570 nm uz propusnik opsega do najviše ± 30 nm.

Optička svojstva ispitivane supstance, odnosno njeno hemijsko delovanje na MTT mogu ometati analizu i dovesti do pogrešne procene vijabilnosti (budući da ispitivana supstanca može da spreči ili okrene proces nastajanja boje, ali i da ga izazove). To se može dogoditi kad se određena ispitivana supstanca ne spere u potpunosti s kože ili prodre u epiderm. Ako ispitivana supstanca direktno deluje na MTT ili je prirodno obojena ili se oboji tokom obrade tkiva, upotrebljavaju se dodatne kontrole kako bi se utvrdio i ispravio uticaj ispitivane supstance na mernu tehniku koja se koristi za merenje vijabilnosti. Detaljan opis ispitivanja direktne redukcije MTT može se naći u protokolu ispitivanja za validirane referentne metode**21,22,23**. Nespecifična boja (Non-specific colour - NSC) usled tih uticaja ne sme da pređe 30% NC (za ispravke). Ako je NSC > 30% smatra se da ispitivana supstanca nije odgovarajuća za ovu metodu.

*1.6.1.5. Kriterijumi za prihvatanje ispitivanja*

U svakom istraživanju sa dobrim serijama (videti odeljak 1.6.1.2.5. ove metode) vrednost OD tkiva obrađenih negativnom kontrolom ukazuje na kvalitet tkiva nakon što su završeni svi koraci isporuke i preuzimanja i čitav postupak u skladu s protokolom za ispitivanje iritacije. Vrednosti OD kontrola ne smeju biti ispod propisanih donjih granica. Isto tako, tkiva obrađena pozitivnom kontrolom tj. 5%-tnim vodenim rastvorom SDS pokazuju zadržanu osetljivost tkiva i sposobnost da reaguju na iritativne supstance u uslovima svakog pojedinačnog ogleda (npr. vijabilnost £ 40% za proverenu referentnu metodu 1 i £ 20% za validiranu referentnu metodu 2). Potrebno je definisati odgovarajuće mere varijabilnosti između uzoraka tkiva u ponavljanjima (npr. ako se koriste standardne devijacije, one su £ 18%).

**2. PODACI I TUMAČENJE REZULTATA**

*2.1. PODACI*

Podaci pojedinačnih uzoraka ponavljanja ispitivanja u svakoj obradi (npr. vrednosti OD i izračunati procenti vijabilnosti ćelija za svaku ispitivanu supstancu, zajedno sa klasifikacijom) prikazuju se u tabelarnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih ogleda. Osim toga, za svaki ogled se navode srednje vrednosti ± standardna devijacija. Za svaku ispitivanu supstancu se navode zapažene interakcije s MTT reagensom i obojenim ispitivanim supstancama.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Na osnovu vrednosti OD za pojedinačne ispitivane uzorke može se izračunati procenat vijabilnosti u odnosu na NC, koja je određena kao 100%. Potrebno je jasno utvrditi i dokumentovati prelomnu vrednost procenta vijabilnosti ćelije koja se koristi za razlikovanje iritativne supstance od neklasifikovanih ispitivanih supstanci i statistički postupak ili postupke koji su korišćeni za vrednovanje rezultata i identifikaciju iritativnih supstanci i dokazati da su one odgovarajuće. Prelomne vrednosti za predviđanje iritacije u vezi s validiranim referentnim metodama:

Smatra se da je ispitivana supstanca iritativna za kožu kategorija 2 UN GHS ako je:

1) vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon obrade manja ili jednaka (≤) 50%.

Smatra se da je ispitivana supstanca van kategorije:

2) ako je vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon obrade viša od (>) 50%.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanim i kontrolnim supstancama:

- hemijski naziv, npr. naziv iz nomenklature IUPAC ili CAS naziv i CAS broj, ako su poznati;

- čistoća i sastav supstance (u masenom procentu/tima);

- fizička i hemijska svojstva važna za sprovođenje istraživanja (npr. agregatno stanje, stabilnost i isparljivost, pH, rastvorljivost u vodi, ako su poznati);

- obrada ispitivanih/kontrolnih supstanci pre ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrevanje, usitnjavanje);

- uslovi skladištenja.

2) Obrazloženju modela kože i protokolu koji je primenjen.

3) Uslovima ispitivanja:

- ćelijski sistem koji je upotrebljen;

- informacije o kalibraciji mernog uređaja i talasnoj dužini koja je upotrebljena kod merenja vijabilnosti ćelija (npr. spektrofotometar);

- potpune propratne informacije o konkretnom kožnom modelu koji je korišćen, uključujući njegove performanse. To naročito uključuje podatke:

(1) vijabilnost;

(2) funkcija barijere;

(3) morfologija;

(4) ponovljivost i predvidljivost;

(5) kontrole kvaliteta (KK) modela;

- detalji postupka ispitivanja;

- doze ispitivanja, trajanje izlaganja i period inkubacije nakon obrade;

- opis mogućih izmena postupka ispitivanja;

- upućivanje na postojeće podatke o modelu; što naročito uključuje:

a) prihvatljivost podataka o kontroli kvaliteta sa upućivanjem na postojeće podatke o seriji;

b) prihvatljivost vrednosti pozitivnih i negativnih kontrola sa upućivanjem na srednje vrednosti i opsega za pozitivne i negativne kontrole,

- opis primenjenih kriterijuma vrednovanja, uključujući obrazloženje odabrane(ih) granične(ih) vrednosti modela predviđanja.

4) Rezultatima:

- tabelarni prikaz podataka za pojedinačne uzorke ispitivanja,

- opis drugih uočenih efekata.

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\_rev02/02files\_e.html.

2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\_document/information\_requirements\_en.htm?time=1232447649.

3. Test Method B.4. ACUTE TOXICITY; DERMAL IRRITATION/CORROSION.

4. Test Method B.40. IN VITRO SKIN CORROSION: TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST TER.

5. Test Method B.40 BIS. IN VITRO SKIN CORROSION: HUMAN SKIN MODEL TEST.

6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method. Adopted July 19, 2006. Available at: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\_2649\_34377\_1916054\_1\_1\_1\_1,00.html.

7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 15, 57-93.

9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology in Vitro 16, 765-770.

10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests. ALTEX 21, 107-114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests - An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351-367.

12. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The In Vitro Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329-249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30,109-129.

14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. 135 pp. + annexes. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.

18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5 November 2008.

19. EC (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union L 396 of 30 December 2006, p. 1. OPOCE, Luxembourg.

20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

21. EpiSkinTM SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test - 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

22. EpiDermTM SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. In Vitro Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

23. SkinEthic RHETM SOP. Will be available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

24. Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, pp 7-18

25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, November 13, 2008.

**Deo drugi**

**DODATAK**

**Procena karakteristika predloženih *in vitro* modela rekonstruisanog humanog epiderma za ispitivanje iritacije kože**

UVOD

Predloženi postupci u okviru ove metode ispitivanja se evaluiraju kako bi se odredila njihova pouzdanost i tačnost, koristeći supstance koje predstavljaju čitav opseg skora iritacije prema Drajzeu. Kod evaluacije predloženih postupaka korišćenjem 20 preporučenih referentnih supstanci (Tabela 2. ove metode) dobijaju se vrednosti pouzdanosti i tačnosti koje su uporedive sa vrednostima validirane referentne metode 1 (Tabela 3. ove metode)**1**. Standardi tačnosti i pouzdanosti se ispunjavaju dati su u tačkama (II) i (III) u daljem tekstu. Obuhvaćene su neklasifikovane i klasifikovane supstance (kategorija 2 UN GHS) koje predstavljaju relevantne hemijske klase, tako da se pouzdanost i karakteristike (osetljivost, specifičnost, udeo lažno negativnih, udeo lažno pozitivnih i tačnost) predložene metode ispitivanja mogu uporediti sa odgovarajućim vrednostima validirane referentne metode 1. Pre nego što se metoda ispitivanja upotrebi za ispitivanje novih supstanci određuje se njena pouzdanost kao i sposobnost da tačno identifikuje iritativne supstance kategorije 2 UN GHS.

STANDARDI IZVOĐENJA

Standardi izvođenja obuhvataju tri elementa: I) bitne elemente metode ispitivanja, II) referentne supstance i III) definisane vrednosti tačnosti i pouzdanosti**2**. Ovi referentni standardi zasnivaju se na standardima izvođenja koji su definisani po završetku validacione studije iritacije kože Evropskog centra za validaciju alternativnih metoda (ECVAM)**3**.

**I. Bitni elementi metode ispitivanja**

*Opšti uslovi koje ispunjava model*

Za izgradnju epitela koristi se normalan tip humanih keratinocita. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja *(stratum corneum)* nalaze se višestruki slojevi vitalnih epitelnih ćelija (bazalni sloj, nazubljen sloj, zrnasti sloj). Rožnati sloj je višeslojan i sadrži esencijalni profil lipida da bi proizveo čvrstu funkcionalnu barijeru sposobnu da zaustavi brzi prodor citotoksičnih marker supstanci, npr. SDS ili Triton X-100. Funkcija barijere može se oceniti određivanjem koncentracije marker supstance koja smanjuje vijabilnost tkiva za 50% (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnosti tkiva smanji za 50% (ET50) nakon primene marker supstance u unapred određenoj fiksnoj koncentraciji. Model mora biti dovoljno nepropustan da spreči prolazak materijala oko rožnatog sloja do vitalnog tkiva, jer bi to značilo loše modeliranje izlaganja kože. Model kože ne sme da bude kontaminiran bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

*Funkcionalni uslovi koje ispunjava model*

Vijabilnost

Poželjna analiza za određivanje stepena vijabilnosti je MTT test**4**. OD ekstrahovane (rastvorene) boje iz tkiva obrađivanog negativnom kontrolom (NC) je najmanje 20 puta veća od vrednosti OD samog ekstrakcionog rastvarača. Potrebno je dokumentovati da je tkivo obrađivano negativnom kontrolom stabilno u kulturi (tj. daje slična merenja vijabilnosti) za vreme trajanja ispitnog izlaganja.

Funkcija barijere

Rožnati sloj i njegov sastav lipida mora biti sposoban da zaustavi brzi prodor citotoksičnih marker supstanci, npr SDS ili Triton X-100, procenjeno na osnovu IC50 ili ET50.

Morfologija

Histološki pregled rekonstruisane kože/epiderma vrši odgovarajuće osposobljeno osoblje, pri čemu dokazuje da je njena struktura slična strukturi humane kože/epiderma (uključujući višeslojni rožnati sloj).

Ponovljivost

Dokazuje se da su rezultati metoda kod primene određenog modela reproducibilni u vremenu, po mogućstvu pomoću odgovarajuće supstance za kontrolu šarže (referentne supstance) (videti definicije date u odeljku 1.2. ove metode).

Kontrole kvaliteta (KK) modela

Svaka serija modela epiderma ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost i funkcija barijere. Opseg prihvatljivosti (gornja i donja granica prihvatljivosti) za IC50 odnosno ET50 određuje snabdevač modela kože (ili istraživač, ako se koristi sopstveni model). Svojstvo barijere tkiva proverava laboratorija po prijemu tkiva. Za pouzdano predviđanje iritativnih efekata prihvatljivi su isključivo rezultati dobijeni sa tkivima koja ispunjavaju zadate kriterijume. Kao primer, navedeni su opsezi prihvatljivosti za validirane referentne metode.

Tabela 1. Primeri kriterijuma za odobrenje lota u okviru kontrole kvaliteta

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Donja granica  prihvatljivosti | Srednja vrednost  područja  prihvatljivosti | Gornja  granica  prihvatljivosti |
| Validirana referentna metoda 1 (18-časovno tretiranje SDS-om) | IC50 = 1,0 mg/ml | IC50 = 2,32 mg/ml | IC50 = 3,0 mg/ml |
| Validirana referentna metoda 2 (1% triton X-100) | ET50 = 4,8 hr | ET50 = 6,7 hr | ET50 = 8,7 hr |

**II. Referentne supstance**

Referentne supstance koriste se da se utvrdi da li je pouzdanost i tačnost predložene nove *in vitro* metode ispitivanja sa rekonstruisanim humanim epidermom, a za koju je dokazano da je strukturno i funkcionalno dovoljno slična validiranoj referentnoj metodi, ili predstavlja neznatno modifikovanu varijantu validirane referentne metode, uporediva sa pouzdanošću i tačnošću validirane referentne metode 1**1**. Dvadeset referentnih supstanci datih u Tabeli 2. obuhvataju supstance iz različitih relevantnih hemijskih klasa kao i supstance iz kategorije 2 UN GHS. Lista sadrži 10 supstanci iz kategorije 2 UN GHS, 3 supstance iz opcione kategorije 3 UN GHS i 7 neklasifikovanih supstanci. U okviru ove metode ispitivanja, opciona kategorija 3. ne smatra se kategorijom. Ove referentne supstance predstavljaju minimalni broj supstanci koji se koristi kod ocenjivanja tačnosti i pouzdanosti predložene metode ispitivanja iritacije kože na modelu rekonstruisanog humanog epiderma. U slučajevima kad supstanca sa liste nije dostupna, mogu se koristiti i druge supstance za koje su dostupni odgovarajući referentni podaci *in vivo*. Ovoj listi referentnih supstanci po želji se mogu dodati još neke supstance koje predstavljaju druge hemijske klase i za koje su dostupni odgovarajući referentni podaci *in vivo*, kako bi se dodatno evaluirala tačnost predložene metode ispitivanja.

Tabela 2. Referentne supstance za određivanje tačnosti i pouzdanosti modela rekonstruisanih humanih epiderma koji se koriste kod ispitivanja iritacije kože

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Supstanca \* | CAS br. | EINECS br. | Agregatno stanje | Rezultat ocenjivanja *in vivo* | Kat. GHS *in vitro* | Kat. GHS *in vivo* |
| 1-brom-4-hlorbutan | 6940-78-9 | 230-089-3 | tečno | 0 | kat. 2 | izvan kat. |
| dietil-ftalat | 84-66-2 | 201-550-6 | tečno | 0 | izvan kat. | izvan kat. |
| naftalen-sirćetna kiselina | 86-87-3 | 201-705-8 | čvrsto | 0 | izvan kat. | izvan kat. |
| alil-fenoksiacetat | 7493-74-5 | 231-335-2 | tečno | 0,3 | izvan kat. | izvan kat. |
| izopropanol | 67-63-0 | 200-661-7 | tečno | 0,3 | izvan kat. | izvan kat. |
| 4-metiltiobenzaldehid | 3446-89-7 | 222-365-7 | tečno | 1 | kat. 2 | izvan kat. |
| metil-stearat | 112-61-8 | 203-990-4 | čvrsto | 1 | izvan kat. | izvan kat. |
| heptil-butirat | 5870-93-9 | 227-526-5 | tečno | 1,7 | izvan kat. | opciona kat. 3 |
| heksil-salicilat | 6259-76-3 | 228-408-6 | tečno | 2 | izvan kat. | opciona kat. 3 |
| tri-izobutil-fosfat | 126-71-6 | 204-798-3 | tečno | 2 | kat. 2 | opciona kat. 3 |
| 1-dekanol | 112-30-1 | 203-956-9 | tečno | 2,3 | kat. 2 | kat. 2 |
| ciklamen-aldehid | 103-95-7 | 203-161-7 | tečno | 2,3 | kat. 2 | kat. 2 |
| 1-bromheksan | 111-25-1 | 203-850-2 | tečno | 2,7 | kat. 2 | kat. 2 |
| 2-hlormetil-3,5-dimetil-4-metoksipiridin-hidrohlorid | 86604-75-3 | 434-680-9 | čvrsto | 2,7 | kat. 2 | kat. 2 |
| a-terpineol | 98-55-5 | 202-680-6 | tečni | 2,7 | kat. 2 | kat. 2 |
| di-*n*-propil-disulfid | 629-19-6 | 211-079-8 | tečno | 3 | izvan kat. | kat. 2 |
| butil-metakrilat | 97-88-1 | 202-615-1 | tečno | 3 | kat. 2 | kat. 2 |
| benzenetiol, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metil | 7340-90-1 | 438-520-9 | tečno | 3,3 | kat. 2 | kat. 2 |
| 1-metil-3-fenil-1-piperazin | 5271-27-2 | 431-180-2 | čvrsto | 3,3 | kat. 2 | kat. 2 |
| heptanal | 111-71-7 | 203-898-4 | tečno | 4 | kat. 2 | kat. 2 |
| \* Ovih 20 referentnih supstanci predstavlja reprezentativni izbor od 58 supstanci koje su prvobitno korišćene u validaciji referentne metode 1 (EpiSkinTM). Potpun spisak ispitivanih supstanci i kriterijuma za njihov izbor dat je u literaturi**5**. | | | | | | |

Supstance navedene u Tabeli 2. predstavljaju reprezentativni izbor od 58 supstanci korišćenih u međunarodnoj validacijskoj studiji iritacije kože Evropskog centra za validaciju alternativnih metoda (u daljem tekstu: ECVAM)**1**. Njihov izbor se zasniva na sledećim kriterijumima:

- ove supstance su dostupne na tržištu,

- reprezentativne su za čitav opseg skora iritacije prema Drajzeu (od iritacije do jake iritacije),

- imaju dobro definisanu hemijsku strukturu,

- reprezentativne su za ponovljivost i predvidljivu sposobnost validirane metode, kako je utvrđeno u validacionoj studiji ECVAM,

- reprezentativne su za hemijsku funkcionalnost koja je korišćena u procesu validacije,

- nemaju ekstremno toksični profil (npr. karcinogeno ili toksično delovanje po reprodukciju) i nisu povezane sa previsokim troškovima odlaganja.

**III. Definisane vrednosti tačnosti i pouzdanosti**

Radne karakteristike (osetljivost, specifičnost, udeo lažno negativnih, udeo lažno pozitivnih i tačnost) predložene metode ispitivanja su uporedive sa odgovarajućim vrednostima validirane referentne metode 1 (Tabela 3), tj. osetljivost je jednaka ili viša (≥) od 80%, specifičnost je jednaka ili viša (≥) od 70% i tačnost je jednaka ili viša (≥) od 75%. One se izračunavaju na osnovu svih klasifikacija 20 supstanci dobijenih u različitim laboratorijama koji su učestvovale u istraživanju. Klasifikacija supstanci u svakoj od laboratorija određuje se na osnovu srednje vrednosti vijabilnosti iz različitih ispitivanja (najmanje tri valjana ispitivanja).

Tabela 3. Karakteristike validirane referentne metode 1 **[XVII]**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda ispitivanja | Broj supstanci | Osetljivost | Specifičnost | Udeo lažno negativnih | Udeo lažno pozitivnih | Tačnost |
| Validirana referentna metoda 1 **[1]** | 58 | 87,2% **[2]** | 71,1% **[3]** | 12,8% | 29,9% | 74,7% |
| Validirana referentna metoda 1 **[1]** | 20 | 90% | 73,3% | 10% | 26,7% | 81,7% |
| **[1]** EpiSkin™  **[2]** Na osnovu 13 iritativnih supstanci 2. kat. GHS.  **[3]** Na osnovu 45 iritativnih supstanci 3. kat. GHS ili hemikalija izvan kategorija GHS. | | | | | | |

Pouzdanost predložene metode ispitivanja je uporediva sa pouzdanošću validirane referentne metode.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVII** U Tabeli 3. prikazane su radne karakteristike validirane referentne metode 1 s obzirom na sposobnost tačnog identifikovanja iritativnih supstanci (kategorija 2 UN GHS) i neklasifikovanih supstanci (izvan kategorije, uključujući opcionu kategoriju 3) za 58 odnosno 20 referentnih supstanci (Tabela 2).

*Ponovljivost u okviru laboratorije*

Kod ocenjivanja varijabilnosti u okviru laboratorije podudarnost između klasifikacija (kategorija 2 / izvan kategorije) dobijenih u različitim nezavisnim ispitivanjima 20 referentnih supstanci u istoj laboratoriji mora biti**3** 90%.

*Ponovljivost između laboratorija*

Procena ponovljivosti između laboratorija nije potrebna ako se predložena metoda ispitivanja koristi samo u jednoj laboratoriji. Ako se metoda koristi u više laboratorija, podudarnost između klasifikacija (kategorija 2 / izvan kategorije) dobijenih u različitim nezavisnim ispitivanjima 20 referentnih supstanci, po mogućstvu u najmanje tri laboratorije, iznosi ≥ 80%.

LITERATURA

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.

3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation. Available under Download Study Documents, at http://ecvam.jrc.ec.europa.eu. Accessed on 27.10.2008.

4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

**B.47. METODA ISPITIVANJA ZAMUĆENJA I PROPUSTLJIVOSTI ROŽNJAČE GOVEČETA RADI IDENTIFIKOVANJA HEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKO OŠTEĆENJE I JAKU IRITACIJU OKA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Metoda ispitivanja zamućenja i propustljivosti rožnjače govečeta (Bovine Corneal Opacity and Permeability, u daljem tekstu: BCOP) jeste metoda ispitivanja *in vitro* koji se pod određenim uslovima i uz određena ograničenja može koristiti za klasifikaciju supstanci i smeša kao onih koje izazivaju teško oštećenje i jaku iritaciju oka**1,2,3**. U ovoj metodi ispitivanja, jako iritativne hemikalije su one koje izazivaju oštećenja oka, koja se kod kunića održavaju najmanje 21 dan nakon primene. Iako se ne vrednuje kao potpuna zamena za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, BCOP se preporučuje za upotrebu kao deo strategije višestepenog ispitivanja za regulatornu klasifikaciju i obeležavanje u okviru određene oblasti primene**4,5**. Ispitivane supstance i smeše**6** mogu se klasifikovati kao one koje izazivaju teško oštećenje oka ili one koje su jako iritativne za oko, bez daljeg ispitivanja na kunićima. Supstanca sa negativnim rezultatom ispitivanja ispituje se na kuniću korišćenjem strategije "korak po korak", koja je definisana u Metodi V.5. koja je data u ovom pravilniku.

Svrha ove metode ispitivanja je da opiše postupke koji se koriste za procenu mogućih svojstava ispitivane hemikalije da izazove teško oštećenje ili jaku iritaciju oka što se meri njenom sposobnošću da izazove zamućenje i povećanu propustljivost izolovane rožnjače govečeta. Toksični efekti na rožnjači se mere na osnovu: 1) smanjenja prenosa svetlosti (neprozirnost, zamućenje) i 2) povećanja prolaza boje natrijum fluoresceina (propustljivost). Procene zamućenja i propustljivosti rožnjače nakon primene ispitivane supstance kombinuju se kako bi se izveo skor iritativnosti *in vitro* (Skor iritacije u *in vitro* uslovima, IVIS) koji se koristi za klasifikaciju prema stepenu iritativnosti ispitivana supstanca.

BCOP metodom ispitane su i iritativne supstance za oko koje izazivaju oštećenja koja nestaju za manje od 21 dana, i neiritativne supstance. Međutim, tačnost i pouzdanost BCOP metode za supstance koje pripadaju ovim kategorijama nisu formalno evaluirani.

*1.2. POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA*

Ova metoda ispitivanja zasniva se na postupku metode BCOP Međuagencijskog koordinacionog odbora za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM)**8**, koji je pripremljen nakon međunarodne validacione studije**4,5,9**, u kojoj su učestvovali Evropski centar za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) i Japanski centar za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM). Postupak je zasnovan na podacima dobijenim od Instituta za istraživanja *In Vitro* (IIVS) i Postupka INVITTOX 124**10**, koji je korišćen u pred-validacionoj studiji BCOP eseja, sprovedenoj u periodu od 1997. do 1998. godine pod pokroviteljstvom Evropske zajednice. Oba postupka su zasnovana na metodologiji ispitivanja BCOP, o kojoj su prvi put izvestili Gojteron i sar.**11**.

Ograničenja koja su prepoznata za ovu metodu ispitivanja zasnivaju se na velikom udelu lažno pozitivnih rezultata za alkohole i ketone i velikom udelu lažno negativnih rezultata za hemikalije u čvrstom stanju zapaženim u bazi podataka korišćenoj za validaciju (videti odeljak 2.2. ove metode)**5**. Ako se supstance iz tih klasa jedinjenja i tog agregatnog stanja isključe iz baze podataka, tačnost BCOP u sistemima za klasifikaciju supstanci EU, EPA (Environmental Protection Agnecy) i GHS znatno se poboljšava**5**. S obzirom na svrhu ovog ispitivanja (tj. da se identifikuju samo hemikalije koje izazivaju teško oštećenje oka i one koje su jako iritativne za oko), procenat lažno negativnih rezultata nije od ključnog značaja, jer se takve supstance zatim ispituju na kuniću, ili, u zavisnosti od normativnih zahteva, sa drugim odgovarajuće validiranim metodama *in vitro*, primenom strategije višestepenog ispitivanja na osnovu kvaliteta podataka. Sadašnja baza podataka za validaciju ne dozvoljava adekvatnu ocenu nekih grupa jedinjenjaili proizvoda (npr. smeša). Međutim, ispitivači mogu da razmotre upotrebu ove metode ispitivanja za sve vrste ispitivanih materijala (uključujući smeše), pri čemu je pozitivan rezultat prihvatljiv kao pokazatelj teškog oštećenja ili jake iritacije oka. Pozitivni rezultati dobijeni sa alkoholima ili ketonima, tumače se oprezno zbog rizika od lažno pozitivnih rezultata.

Kod svih postupaka sa goveđim očima i rožnjačama pridržavati se važećih pravila i postupaka za objekte u kojima se vrši ispitivanje za rukovanje materijalom životinjskog porekla, što uključuje između ostalog, tkiva i tkivne tečnosti. Preporučuju se opšte laboratorijske mere predostrožnosti**12**.

Ograničenje ove metode ispitivanja je u tome što iako uzima u obzir neke efekte na oku koji su ocenjeni metodom ispitivanja iritativnosti na oku kunića, i u izvesnoj meri, njenu jačinu, ne uzima u obzir oštećenja vežnjače i dužice. Takođe, iako se reverzibilnost oštećenja rožnjače u BCOP ne može proceniti sama po sebi, predloženo je, na osnovu studija na oku kunića, da se ocena početne dubine oštećenja rožnjače može koristiti za razlikovanje reverzibilnih i ireverzibilnih efekata**13**. BCOP metodom ispitivanja ne može da se proceni moguća sistemska toksičnost povezana sa izlaganjem preko oka.

Nastoji se da se detaljnije okarakterišu korisnost i ograničenja metode BCOP za identifikaciju hemikalija koje nisu jako iritativne ili nisu iritativne (videti odeljak 2.2. ove metode). Korisnici se takođe podstiču da daju organizacijama za validaciju uzorke i/ili podatke za formalnu ocenu mogućih budućih upotreba metode BCOP, uključujući i za identifikovanje hemikalija koje nisu jako iritativne i neiritativnih supstanci.

Svaka laboratorija koja ovu metodu uvodi po prvi put, treba da koristi hemikalije za proveru sposobnosti date u Dodatku 2. ove metode. Laboratorija može da koristi ove hemikalije da pokaže tehničku kompetentnost u izvođenju metode BCOP pre nego što dostavi podatke ispitivanja BCOP radi normativne klasifikacije opasnosti.

*1.3. PRINCIP METODE*

Metoda ispitivanja BCOP je organotipski model koji obezbeđuje kratkoročno održavanje normalne fiziološke i biohemijske funkcije rožnjače govečeta u *in vitro* uslovima. U ovoj metodi, oštećenje nastalo usled izlaganja ispitivanoj supstanci procenjuje se kvantitativnim merenjima promena u prozirnosti i propustljivosti rožnjače opacitometrom i spektrofotometrom u oblasti vidljive svetlosti. Oba merenja se koriste za izračunavanje IVIS, koji se se koristi za dodeljivanje kategorije u okviru klase opasnosti iritacija u *in vitro* uslovima za predviđanje potencijala za iritativno delovanje ispitivane supstance na oko *in vivo* (videti Kriterijume za odlučivanje).

U metodi ispitivanja BCOP koriste se izolovane rožnjače očiju sveže zaklanih goveda. Zamućenje rožnjače meri se kvantitativno kao količina svetlosti koja prolazi kroz rožnjaču. Propustljivost se meri kvantitativno kao količina boje natrijum fluoresceina, koja prodire kroz celu debljinu rožnjače i detektuje se u medijumu u zadnjoj komori. Ispitivane supstance se primenjuju na epitelnu površinu rožnjače tako što se dodaju u prednju komoru držača rožnjače. Dodatak 3. ove metode sadrži opis i dijagram držača rožnjače koji se koristi za BCOP. Držači rožnjače mogu se nabaviti na tržištu iz različitih izvora ili ih laboratorije mogu proizvoditi za sebe.

**1.3.1. Poreklo i starost goveđih očiju i izbor životinjske vrste**

Goveda u klanicama obično se ubijaju za ljudsku ishranu ili za druge komercijalne svrhe. Kao izvor rožnjača za ispitivanje BCOP koriste se samo zdrave životinje pogodne za ulazak u lanac ishrane ljudi. S obzirom da kod goveda postoji širok raspon telesne mase, zavisno od rase, starosti i pola, ne postoji preporučena telesna masa za životinju u vreme klanja.

Do razlika u veličini rožnjače može doći kada se koriste oči životinja različite starosti. Rožnjače horizontalnog prečnika > 30,5 mm i centralne debljine rožnjače (u daljem tekstu: CCT) ≥ 1.100 μm obično se dobijaju od stoke starije od osam godina, dok se one sa horizontalnim prečnikom < 28,5 mm i CCT < 900 μm uglavnom dobijaju od goveda mlađih od pet godina**14**. Zbog toga se obično ne koriste oči stoke starije od 60 meseci. Oči stoke starosti ispod 12 meseci takođe se obično ne koriste jer još nisu u potpunosti razvijene, debljina i prečnik rožnjače su znatno manji nego kod očiju odrasle stoke. Dozvoljena je upotreba rožnjača mladih životinja (tj. starosti između šest i 12 meseci) jer ima prednosti, kao na primer veću dostupnost, uži starosni opseg i manji rizik od eventualne izloženosti radnika goveđoj spongiformnoj encefalopatiji**15**. Korisna je dalja ocena uticaja veličine i debljine rožnjače na odgovor na supstance koje izazivaju teško oštećenje ili jaku iritaciju oka, te se korisnici podstiču da navode procenjenu starost i/ili telesnu masu životinja od kojih su dobijene rožnjače korišćene u studiji.

**1.3.2. Sakupljanje i transport očiju u laboratoriju**

Oči sakuplja osoblje klanice. Da bi se mehaničke i druge vrste oštećenja svele na minimum, oči se vade što je moguće pre posle smrti. Da bi se sprečilo izlaganje očiju potencijalnim iritativnim supstancama, osoblje klanice pri ispiranju glava životinja ne sme da koristi detergente.

Oči se potpuno potope u Hanksov izbalansirani rastvor soli (u daljem tekstu: HBSS) u posudi odgovarajuće veličine i transportovati u laboratoriju tako da se propadanje i/ili kontaminacija bakterijama svede na najmanju meru. Pošto se oči sakupljaju tokom procesa klanja, mogu da dođu u kontakt sa krvlju i drugim biološkim materijalom, uključujući bakterije i druge mikroorganizme. Zato je važno da se obezbedi da rizik od kontaminacije bude sveden na minimum (npr. držanjem kontejnera sa očima na mokrom ledu, dodavanjem antibiotika u HBSS koji je korišćen za skladištenje očiju tokom transporta (npr. penicilin 100 IU/mL i streptomicin 100 μg/mL)).

Vreme između sakupljanja očiju i upotrebe rožnjača u BCOP treba da bude što je moguće kraće (obično se sakupe i koriste istog dana) i pokazuje se da se ne umanjuje vrednost rezultata ispitivanja. Ovi rezultati su zasnovani na kriterijumima za izbor očiju, kao i odgovorima pozitivnih i negativnih kontrola. Sve oči koje se koriste u ispitivanju pripadaju istoj grupi očiju, sakupljenoj određenog dana.

**1.3.3. Kriterijumi za izbor očiju koje se koriste u BCOP**

Kada stignu u laboratoriju, oči je potrebno pažljivo pregledati kako bi se uočili oštećenja uključujući i smanjenu prozirnost, ogrebotine i neovaskularizaciju. Mogu se koristiti samo rožnjače očiju bez takvih defekata.

Kvalitet svake rožnjače ocenjuje se i u kasnijim fazama ispitivanja. Rožnjače sa zamućenjem preko sedam jedinica (napomena: opacitometer je kalibrisan sa standardima zamućenja koji se koriste za uspostavljanje jedinica zamućenja, videti Dodatak treći ove metode), posle početnog perioda od sat vremena uspostavljanja ravnoteže, odbacuju se.

Svaka ispitivana grupa (ispitivana supstanca, paralelne negativne i pozitivne kontrole) sastoji se od najmanje tri oka. Kod metode BCOP za negativnu kontrolu upotrebljavaju se tri rožnjače. Pošto su sve rožnjače isečene iz cele očne jabučice i smeštene u komore za rožnjače, postoji mogućnost da usled uticaja ljudskog faktora pri rukovanju dođe do uticaja na pojedinačne vrednosti zamućenja i propustljivosti rožnjače (uključujući i negativne kontrole). Vrednosti zamućenja i propustljivosti dobijene za rožnjače iz negativne kontrolne grupe koriste se za korigovanje vrednosti zamućenja i propustljivosti dobijene za grupe tretirane predmetom ispitivanja i grupe tretirane pozitivnom kontrolom u izračunavanju IVIS.

*1.4. POSTUPAK*

**1.4.1. Priprema oka**

Neoštećene rožnjače seciraju se tako da se održi 2 mm do 3 mm širok rub beonjače, što olakšava dalje rukovanje, vodeći računa da se epitel i endotel rožnjače ne oštete. Izolovane rožnjače se pričvršćuju na držače specijalno namenjene za to, koji se sastoje od prednjeg i zadnjeg odeljka, koji su, redom, u kontaktu sa epitelnim i endotelnim stranama rožnjače. Obe komore se do vrha ispunjavaju zagrejanim Iglovim minimalnim osnovnim medijumom (u daljem tekstu: EMEM) (prvo zadnja komora), vodeći računa da se ne stvaraju mehurići. Uređaj se potom dovodi u ravnotežu na 32° C ± 1° C najmanje jedan sat da rožnjače mogu da budu ujednačene sa medijumom i da se postigne normalna metabolička aktivnost što je više moguće (približna temperatura na površini rožnjače *in vivo* je 32° C).

Nakon perioda uspostavljanja ravnoteže u obe komore dodaje se svež, prethodno zagrejan medijum EMEM i očitava se bazna linija zamućenja za svaku rožnjaču. Rožnjače sa makroskopskim oštećenjem tkiva (na primer, ogrebotine, pigmentacija, neovaskularizacija) ili sa zamućenjem od više od sedam jedinica zamućenja se odbacuju. Izračunava se prosečno zamućenje svih rožnjača u ravnoteži. Za negativnu (ili rastvarač) kontrolu biraju se najmanje tri rožnjače sa vrednostima zamućenja blizu srednje vrednosti za sve rožnjače. Preostale rožnjače se zatim raspoređuju u grupu za dalje tretiranje i pozitivnu kontrolnu grupu.

Pošto je toplotni kapacitet vode veći nego za vazduh, voda obezbeđuje stabilnije temperaturne uslove za inkubaciju. Zbog toga se preporučuje korišćenje vodenog kupatila za održavanje temperature držača rožnjače i njegovog sadržaja na 32° C ± 1° C. Mogu se koristiti i vazdušni inkubatori, što podrazumeva mere predostrožnosti da se održi stabilnost temperature (npr. prethodnim zagrevanjem držača i medijuma).

**1.4.2. Primena ispitivane supstance**

Koriste se dva različita postupka tretiranja - jedan za tečnosti i surfaktante (u čvrstom ili tečnom stanju) i jedan za hemikalije u čvrstom stanju koji nisu surfaktanti.

Tečnosti se ispituju nerazblažene, dok se surfaktanti ispituju u koncentraciji od 10% w/v u 0,9% rastvoru natrijum hlorida, destilovanoj vodi ili nekom drugom rastvaraču, za koji je dokazano da nema štetni efekte na sistem za ispitivanje. Polučvrste hemikalije, kreme i voskovi se obično ispituju kao tečnosti. Ako se koriste druge koncentracije rastvora, na odgovarajući način se obrazlažu. Rožnjače se izlažu tečnostima i surfaktantima 10 minuta. Ako je vreme izloženosti drugačije, daje se odgovarajuće naučno obrazloženje.

Čvrste hemikalije koje nisu surfaktanti obično se ispituju kao 20% rastvori ili suspenzije pripremljeni u 0,9% rastvoru natrijum hlorida, destilovanoj vodi ili nekom drugom rastvaraču, za koji je dokazano da nema štetne efekte na sistem za ispitivanje. U određenim okolnostima i uz naučno opravdanje, hemikalije u čvrstom stanju mogu se ispitivati jednostavno neposrednim nanošenjem na površinu rožnjače, koristeći metodu otvorene komore (videti poslednji pasus ovog odeljka). Rožnjače se izlažu hemikalijama u čvrstom stanju četiri sata, ali kao i kod tečnosti i surfaktanata, može se koristiti drugačije vreme izlaganja, uz naučno obrazloženje.

Mogu se koristiti različite metode tretiranja u zavisnosti od fizičkih i hemijskih svojstava hemikalije (tj. hemikalije u čvrstom stanju, tečnosti, viskozne tečnosti ili neviskozne). Najvažnije je obezbediti da ispitivana supstanca adekvatno pokriva epitelnu površinu i da se na adekvatan način uklanja tokom ispiranja. Metoda zatvorene komore obično se koristi za neviskozne do malo viskozne ispitivane supstance, dok se metoda otvorene komore obično koristi za poluviskozne i viskozne tečne ispitivane supstance i čiste hemikalije u čvrstom stanju.

Kod metode zatvorene komore, preko otvora za doziranje na gornjoj površini prednje komore dodaje se toliko ispitivane supstance (750 μL) da prekrije epitelnu stranu rožnjače, a otvori se zatim za vreme izlaganja pečate sa zaptivnim čepovima. Neophodno je da se obezbedi da svaka rožnjače bude dovoljno dugo izložena ispitivanoj supstanci.

Kod metode otvorene komore, pre tretmana, sa prednje komore se uklanja prsten za zaptivanje prozora i staklo prozora. Kontrolna ili ispitivana supstanca (750 μL, ili dovoljno ispitivane supstance da potpuno prekrije rožnjače) nanosi se direktno na epitelnu površinu rožnjača koristeći mikropipete. Ako se ispitivana supstanca teško pipetira, ona se može naneti pod pritiskom u pipetu sa klipnim nastavkom radi lakše primene doze. Nastavak ove pipete stavlja se u vrh šprica tako da hemikalija može napuniti klipni nastavak pod pritiskom. Dok se klip šprica polako potiskuje, klip pipete se povlači na gore. Ako se u nastavku pipete pojave mehurići vazduha, predmet ispitivanja se uklanja (izbacuje) i postupak se ponavlja sve dok se nastavak ne napuni bez mehurića. Ako je potrebno, može se koristiti obični špric (bez igle), koji omogućava merenje tačne zapremine ispitivane supstance i lakše nanošenje na epitelnu površinu rožnjače. Nakon primene doze, na prednju komoru se ponovo namesti staklo prozora i ponovo se uspostavlja zatvoreni sistem.

**1.4.3. Inkubacija posle izlaganja**

Nakon perioda izlaganja ispitivana supstanca, supstanca za negativnu kontrolu ili supstanca za pozitivnu kontrolu uklanjaju se iz prednje komore, a epitel se ispira najmanje tri puta (ili dok se ispitivana supstanca više ne vidi) sa EMEM (koji sadrži fenol crveno). Za ispiranje se koristi medijum koji sadrži fenol crveno, jer se promena boje fenol crvenog može pratiti da se utvrdi da li je ispiranje kiselih ili alkalnih hemikalija bilo delotvorno. Ako je fenol crveno još uvek promenjene boje (žuta ili ljubičasta) ili ako je ispitivana supstanca i dalje vidljiva, rožnjače se ispiraju više od tri puta. Kada u medijumu više nema ispitivane supstance, rožnjače se konačno ispiraju sa EMEM (bez fenol crvenog). EMEM (bez fenol crvenog) se koristi za konačno ispiranje da se osigura uklanjanje fenol crvenog iz prednje komore pre merenja zamućenja. Zatim se prednja komora napuni svežim EMEM bez fenol crvenog.

Za tečnosti ili surfaktante, rožnjače se nakon ispiranja inkubiraju još dva sata na 32° C ± 1° C. U određenim okolnostima, korisna je duža inkubacija nakon izlaganja, ali to zavisi od svakog pojedinačnog slučaja. Rožnjače na kojima se ispituju čvrste supstance, posle četiri sata izlaganja se temeljno ispiraju, ali ne zahtevaju dalju inkubaciju.

Na kraju perioda inkubacije nakon izlaganja za tečnosti i surfaktante i nakon završetka četiri sata izlaganja za čvrste supstance koje nisu surfaktanti, beleže se zamućenje i propustljivost svake rožnjače. Osim toga, svaka rožnjača se vizuelno pregleda i evidentiraju se sva bitna zapažanja (na primer: ljuštenje tkiva, prisustvo ostataka ispitivane supstance, neujednačena zamućenja). Ova zapažanja mogu biti važna, jer mogu da se odraze na varijacije u očitavanju opacitometrom.

Kontrolne supstance

U svaki eksperiment uključuje se paralelna negativna kontrola ili kontrola rastvarača/nosača i pozitivna kontrola.

Kod ispitivanja supstance u tečnom stanju u koncentraciji 100% u metodi ispitivanja BCOP uključuje se paralelna negativna kontrola (npr. 0,9 % rastvor natrijum hlorida ili destilovana voda) da se otkriju nespecifične promene u sistemu za ispitivanje i da se obezbedi bazna linija za efekte koji se ispituju. Ovim se osigurava i da uslovi ispitivanja ne prouzrokuju iritativne reakcije.

Kod ispitivanja razblažene tečnosti, surfaktanta ili hemikalije u čvrstom stanju u metodi BCOP uključuje se paralelna kontrolna grupa rastvarača/nosača radi otkrivanja nespecifičnih promena u sistemu za ispitivanje i kako bi se obezbedila bazna linija za posmatrane efekte. Može se koristiti samo rastvarač/nosač za koji je dokazano da nema štetne efekte na sistem za ispitivanje.

U svaki eksperiment uključen je poznati iritans za oko kao paralelna pozitivna kontrola kako bi se proverilo da li je izazvan odgovarajući odgovor. Pošto se metoda BCOP koristi za identifikovanje supstanci koje dovode do teškog oštećenja ili jake iritacije oka, u idealnom smislu pozitivna kontrola je referentna supstanca koja u ovoj metodi ispitivanja izaziva jak odgovor. Da bi se obezbedila mogućnost ocenjivanja varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tokom vremena, stepen iritacije ne treba da bude prevelik.

Primeri pozitivnih kontrola za ispitivane supstance u tečnom stanju su dimetilformamid ili 1% natrijum hidroksid. Primer pozitivne kontrole za ispitivane supstance u čvrstom stanju je 20% (w/v) imidazola u 0,9% rastvoru natrijum hlorida.

Referentne supstance su pogodne za ocenu potencijala za izazivanje iritacije oka nepoznate hemikalije specifične hemijske ili proizvodne klase klase jedinjenja ili proizvoda, ili za ocenu relativnog iritativnog potencijala iritansa za oko u određenom rasponu iritativnih odgovora.

**1.4.4. Merenje efekata**

Zamućenje je određeno količinom svetlosti koja prodire kroz rožnjaču. Zamućenje rožnjače kvantitativno se meri pomoću opacitometra, tako da se vrednosti zamućenja mere na kontinuiranoj skali.

Propustljivost se određuje količinom boje natrijum fluoresceina koja prodire kroz sve slojeve ćelija rožnjače (tj. od epitela na spoljašnjoj površini rožnjače do endotela na unutrašnjoj površini rožnjače). U prednju komoru držača rožnjače koja se graniči sa epitelnom stranom rožnjače dodaje se 1 ml rastvora natrijum fluoresceina (4 mg/ml ili 5 mg/ml kod ispitivanja tečnosti i surfaktanata, odnosno supstanci u čvrstom stanju koje nisu surfaktanti), dok se zadnja komora ka endotelnoj strani rožnjače, ispunjava svežim EMEM. Držač se zatim inkubira u vodoravnom položaju 90 minuta ± 5 minuta na 32° C ± 1° C. Količina natrijum fluoresceina koja pređe u zadnju komoru se kvantitativno meri pomoću UV/VIS spektrofotometrije. Spektrofotometrijska merenja na 490 nm beleže se kao vrednosti optičke gustine (u daljem tekstu: OD490) ili apsorbancije, koje se mere na kontinuiranoj skali. Vrednosti propustljivosti fluorosceina se određuju pomoću vrednosti OD490 koje su izmerene spektrofotometrom u oblasti vidljive svetlosti pri standardnoj dužini puta od 1 cm.

Umesto spektrofotometra može se koristiti i čitač mikrotitarskih ploča sa 96-mesta, ako: 1) se može utvrditi linearni opseg čitača za određivanje vrednosti OD490 fluoresceina i 2) ako se u mikrotitarskim pločama sa 96-mesta koriste tačne zapremine fluorescina koje obezbeđuju da vrednosti OD490 odgovaraju onim dobijenim na standardnim dužinama puta od 1 cm (za ovo bi možda bio potreban potpuno pun bazenčić (obično 360 mL)).

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

**2.1. Ocenjivanje podataka**

Posle korigovanja vrednosti zamućenja i srednje vrednosti propustljivosti (OD490) za pozadinske vrednosti zamućenja i vrednosti propustljivosti negativne kontrole OD490, srednje vrednosti zamućenja i propustljivosti OD490 za svaku ispitivanu grupu sastavljaju se u empirijski izvedenu formulu kojom se izračunava skor iritacije u *in vitro* uslovima (IVIS) za svaku ispitivanu grupu, na sledeći način:

IVIS = srednja vrednost zamućenja + (15 × srednja vrednost propustljivosti OD490)

Po Sini i saradnicima**16** ova formula je izvedena na osnovu laboratorijskih i međulaboratorijskih studija. Podaci prikupljeni tokom studije za 36 jedinjenja izvedene u više laboratorija, podvrgnuti su multivarijantnoj analizi kako bi se odredila najprikladnija formula za poređenje podataka *in vivo* i *in vitro*. Analizu su izvršili istraživači iz dve različite kompanije i izveli gotovo identične jednačine.

Vrednosti zamućenja i propustljivosti ocenjuju se nezavisno da se utvrdi da li je ispitivana supstanca izaziva teško oštećenje ili jaku iritaciju kroz samo jedan od dva efekta (videti Kriterijume za odlučivanje).

**2.2. Kriterijumi za odlučivanje**

Supstanca koja pokazuje IVIS ≥ 55,1 definiše se kao ona koja izaziva teško oštećenje oka ili kao jako iritativna. Kao što je navedeno u Uvodu ove metode, ako ispitivana supstanca nije određena kao ona koja izaziva teško oštećenje oka ili jako iritativna za oko, vrši se dodatno ispitivanje radi klasifikacije i obeležavanja. U poređenju sa podacima metode ispitivanja *in vivo* na oku kunića, klasifikovanim po sistemima klasifikacije EPA**1**, EU**2** ili GHS**3**, ukupna tačnost metode ispitivanja BCOP je 79% (113/143) do 81% (119/147), udeo lažno pozitivnih rezultata, 19% (20/103) do 21% (22/103), a procenat lažno negativnih rezultata 16% (7/43) do 25% (10/40). Ako se iz baze podataka isključe supstance određenih klasa jedinjenja (npr. alkohol, ketoni) ili agregatnog stanja, tačnost ispitivanja BCOP u sistemima klasifikacije EU, EPA i GHS se kreće od 87% (72/83) do 92 odsto (78/85), udeo lažno pozitivnih rezultata, 12% (7/58) do 16% (9/56), a procenat lažno negativnih rezultata od 0% (0/27) do 12% (3/26).

Čak i ako za hemikalije koje izazivaju teško oštećenje oka i jako iritativne supstance za oko nije dobijena klasifikacija, združivanjem podataka dobijenih u BCOP i ispitivanju *in vivo* na oku kunića ili odgovarajuće validiranim *in vitro* ispitivanjem, može biti korisno za dalju ocenu korisnosti i ograničenja metode ispitivanja BCOP za identifikaciju supstanci koje nisu jako iritativne i koje nisu iritativne (u pripremi su smernice za upotrebu metoda ispitivanja za *in vitro* ispitivanje toksičnosti za oko).

**2.3. Kriterijumi za prihvatljivost studije**

Ispitivanje se smatra prihvatljivim ako se vrednost IVIS pozitivne kontrole kreće u okviru dve standardne devijacije od prosečne vrednosti ranijih ispitivanja koja se trenutno koristi i koja se ažurira najmanje jednom u tri meseca ili kad god ispitivanje vrše laboratorije koje ispitivanja vrše retko (tj. manje od jednom mesečno). Odgovori negativne kontrole ili kontrole rastvarača/nosača daju vrednosti zamućenja i propustljivosti koje su niže od utvrđenih gornjih granica pozadinskih vrednosti za zamućenje i propustljivosti rožnjača goveda tretiranih sa negativnim kontrolama ili kontrolama sa rastvaračem/nosačem.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o (ako su relevantni za sprovođenje studije):

1) Ispitivanim i kontrolnim supstancama:

- hemijski naziv i to CAS naziv i ostali nazivi ako su poznati;

- registarski broj (RN) CAS, ako je poznat;

- čistoća i sastav supstanci ili smeša (u masenim procentima), ako je takva informacija dostupna;

- fizičko-hemijska svojstva relevantna za sprovođenje studije, npr. agregatno stanje, isparljivost, pH vrednost, stabilnost, klasa jedinjenja, rastvorljivost u vodi;

- obrada ispitivanih/kontrolnih supstanci pre ispitivanja, ako je potrebno (npr. zagrevanje, usitnjavanje);

- stabilnosti, ukoliko je poznata.

2) Sponzoru i ispitivanoj laboratoriji:

- ime i adresa sponzora, ispitivane laboratorije i rukovodioca ispitivanja;

- podaci o izvoru očiju (tj. objekat iz kojeg su uzeti);

- uslovi skladištenja i transporta očiju (tj. dan i vreme sakupljanja očiju, vremenski period pre početka ispitivanja, trensportni medijum i temperaturni uslovi, eventualna upotreba antibiotika);

- specifične karakteristike životinja od kojih su uzete oči, ako je poznato (npr. starost, pol, telesna masa životinje davaoca).

3) Opravdanosti metode ispitivanja i postupci koji su korišćeni:

- integritet metode ispitivanja

- postupak da se obezbedi integritet (tj. tačnost i pouzdanost) metode ispitivanja tokom vremena (npr. periodična ispitivanja referentnih supstanci za proveru sposobnosti, korišćenje podataka negativne i pozitivne kontrole iz ranijih ispitivanja).

4) Kriterijumima za prihvatanje ispitivanja:

- prihvatljivi opsezi za paralelne pozitivne i negativne kontrole na osnovu podataka iz ranijih ispitivanja;

- prihvatljivi opsezi za paralelne referentne kontrole na osnovu podataka iz ranijih ispitivanja.

5) Uslovima ispitivanja:

- opis korišćenog sistema za ispitivanje;

- vrsta upotrebljenog držača rožnjače;

- podaci o kalibraciji uređaja za merenje zamućenja i propustljivosti (npr. opacitometra i spektrofotometar);

- podaci o upotrebljenim goveđim rožnjačama, uključujući i izjave o njihovom kvalitetu;

- detalji o korišćenom postupku ispitivanja;

- koncentracije ispitivanih supstanci koje su primenjene;

- opis svake promene ispitivanog postupka;

- pozivanje na podatke iz ranijih ispitivanja modela (tj. negativnih i pozitivnih kontrola, supstanci za proveru sposobnosti, referentne supstance);

- opis korišćenih kriterijuma za ocenjivanje.

6) Rezultatima:

- tabelarni prikaz podataka za pojedinačne ispitivane uzorke (npr. vrednosti zamućenja i OD490 kao i izračunate vrednosti IVIS za ispitivane supstance i pozitivne, negativne i referentne kontrole (ako su uzete u obzir), uključujući i podatke za replikate iz ponovljenih eksperimenata, ako postoje, i srednje vrednosti ± standardna devijacija za svaki eksperiment);

- opis drugih uočenih efekata.

7) Tumačenju rezultata.

8) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

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

2. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.

3. UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Available: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\_rev02/02files\_e.html

4. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm

5. ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_tmer.htm

6. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.

7. OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\_2649\_34377\_37051368\_1\_1\_1\_1,00.html

8. ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_tmer.htm

9. ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_ice.htm

10. INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay - SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

11. Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. Fundam. Appl. Toxicol. 18:442-449.

12. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf.

13. Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36:106-117.

14. Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. Can. J. Zool. 73:2159-2165.

15. Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

16. Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. Fundam Appl Toxicol 26:20-31.

17. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available:http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_bcop.htm

18. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available:http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_bcop.htm

**Deo drugi**

**DODATAK 1.**

DEFINICIJE

Tačnost jeste stepen ujednačenosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrednosti. Ona je merilo karakteristika metode ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Često se koristi u istom značenju kao "usklađenost" kako bi se označio udeo tačnih rezultata metode ispitivanja.

Referentna supstanca jeste supstanca koja se koristi kao standard za poređenje sa ispitivanom supstancom. Referentna supstanca ima sledeća svojstva: 1) stalan i pouzdan izvor; 2) strukturnu i funkcionalnu sličnost sa klasom jedinjenja koje se ispituje; 3) poznata fizička/hemijska svojstva; 4) podatke o poznatim efektima i 5) poznati potencijal u opsegu očekivanog odgovora.

Rožnjača jeste prozirni deo prednjeg dela očne jabučice koji pokriva vežnjaču i dužicu i propušta svetlost u unutrašnjost.

Zamućenje rožnjače jeste mera obima zamućenosti rožnjače nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Povećano zamućenje rožnjače ukazuje na oštećenje rožnjače. Zamućenje se može evaluirati subjektivno kao kod Drajzeove metode na oku kunića ili objektivno pomoću instrumenta kao što je opacitometar. Propustljivost rožnjače jeste kvantitativna mera oštećenja epitela rožnjače određivanjem količine boje natrijum fluoresceina koja prolazi kroz sve slojeve ćelija rožnjače.

EPA kategorija 1 jeste korozivno (ireverzibilno uništavanje tkiva oka) koje oštećuje rožnjaču ili izaziva iritaciju koja se održava više od 21 dan**1**.

EU kategorija R41 jeste oštećenje tkiva oka, ili ozbiljno fizičko propadanje vida, nakon nanošenja ispitivane supstance na prednju površinu oka, koja nije u potpunosti reverzibilna u roku od 21 dana od primene**2**.

Udeo lažno negativnih jeste udeo svih pozitivnih supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao negativne. Jedan je od pokazatelja karakteristika metode ispitivanja.

Udeo lažno pozitivnih jeste udeo svih negativnih supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja karakteristika metode ispitivanja.

GHS jeste Globalno harmonizovani sistem za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija, odnosno sistem koji predlaže klasifikaciju hemikalija (supstanci i smeša) prema standardizovanim vrstama i nivoima fizičkih opasnosti i opasnosti po zdravlje ljudi i životnu sredinu, koji obuhvata i odgovarajuće elemente komunikacije, kao što su: piktogrami, znakovi opasnosti, pisana upozorenja, oznake rizika i bezbednosti i bezbednosni listovi, da bi se prenela informacija o njihovim štetnim efektima sa ciljem da se zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prevoznike, potrošače i pružaoce pomoći u vanrednim situacijama) i životna sredina**3**.

GHS kategorija 1 jeste oštećenje tkiva oka, ili ozbiljno fizičko propadanje vida, nakon nanošenja ispitivane supstance na prednju površinu oka, koja nije potpuno reverzibilna u roku od 21 dana od primene**3**.

Opasnost jeste svojstvo agensa ili situacije koje može da dovede do štetnih efekata kada su organizam, sistem ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Skor iritacije u *in vitro* uslovima (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS) jeste vrednost koja se računa prema empirijski izvedenoj formuli koja se koristi u metodi BCOP pomoću koje se srednje vrednosti zamućenja i propustljivosti za svaku ispitivanu grupu kombinuju u jedan jedinstveni skor *in vitro* za svaku tretiranu grupu. IVIS = srednja vrednost zamućenja + (15 × srednja vrednost propustljivosti).

Negativna kontrola jeste netretirani uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje. Ovaj uzorak se obrađuje sa uzorcima tretiranim ispitivanom supstancom i drugim kontrolnim uzorcima da utvrdi ima li interakcije između rastvarača i sistema za ispitivanje.

Hemikalija koja nije iritativna jesu supstance koje nisu klasifikovane kao supstance iritativne za oko ERA kategorije 1, 2, ili 3; EU kategorije R41 ili R36 ili GHS kategorije 1, 2A ili 2B.

Hemikalija koja izaziva teško oštećenje oka jeste: a) supstanca koja izaziva ireverzibilno oštećenje tkiva oka; b) supstance koje su klasifikovane kao iritativne za oko GHS kategorije 1, ERA kategorije 1, ili EU kategorije R41**1,2,3**.

Iritativno za oko jeste: a) supstanca koja dovodi do reverzibilne promene u oku nakon nanošenja na prednju površinu oka; b) supstance koje su klasifikovane kao supstance iritativne za oko ERA kategorije 2 ili 3 EU kategorije R36 ili GHS kategorije 2A ili 2B**1,2,3**.

Jako iritativno za oko jeste: a) supstanca koja izaziva oštećenje tkiva oka nakon nanošenja na prednju površinu oka koje se ne povlači u roku od 21 dana od dana nanošenja ili izaziva ozbiljno fizičko propadanje vida, b) supstance koje su klasifikovane kao supstance iritativne za oko GHS kategorije 1, ERA kategorije 1, ili EU kategorije R41**1,2,3**.

Opacitometar jeste instrument koji se koristi za merenje zamućenja rožnjače kvantitativnom evaluacijom prenošenja svetlosti kroz rožnjaču. Tipičan instrument ima dva odeljka, svaki sa sopstvenim izvorom svetlosti i fotoćelijom. Jedan odeljak se koristi za tretiranu rožnjaču, a drugi se koristi za kalibraciju i podešavanje instrumenta na nultu vrednost. Svetlost iz halogene lampe se šalje kroz kontrolni odeljak (prazna komora bez prozora ili tečnosti) u fotoćeliju i upoređuje sa svetlošću koja se šalje kroz eksperimentalni odeljak, u kome se nalazi komora sa rožnjačom, u fotoćeliju. Upoređuje se razlika u prenošenju svetlosti iz fotoćelija i na digitalnom ekranu se prikazuje numerička vrednost zamućenja.

Pozitivna kontrola jeste uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje i koji se tretira supstancom za koju se zna da izaziva pozitivni odgovor. Da bi se obezbedilo da varijabilnost u odgovoru pozitivne kontrole može da se ocenjuje tokom vremena, jačina odgovora ne sme da bude preterana.

Pouzdanost pokazuje u kojoj meri metoda ispitivanja može ponovljivo da se izvodi unutar jedne laboratorije i između više laboratorija tokom vremena uz primenu istog postupka. Ocenjuje se izračunavanjem ponovljivosti unutar jedne laboratorije i između više laboratorija.

Kontrola rastvarača/nosača jeste netretirani uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje, uključujući rastvarač ili nosač koji se obrađuje sa uzorcima tretiranim ispitivanom supstancom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila bazna linija odgovora za uzorke tretirane ispitivanom supstancom rastvorenom u tom rastvaraču ili nosaču. Kada se ispituje sa paralelnom negativnom kontrolom, ovaj uzorak pokazuje i da li rastvarač ili nosač reaguje sa sistemom za ispitivanje.

Višestepeno ispitivanje jeste strategija ispitivanja korak po korak gde se određenim redosledom pregledaju sve postojeće informacije o ispitivanoj supstanci, pri čemu se na svakom koraku koristi postupak procene kvaliteta podataka da bi se utvrdilo da li postoji dovoljno informacija za odluku o klasifikovanju supstance kao opasne, pre prelaska na sledeći stepen. Ako se na osnovu postojećih informacija može pripisati iritativni potencijal ispitivanoj supstanci, nije potrebno dodatno ispitivanje. Ako se na osnovu postojećih informacija ne može pripisati iritativni potencijal ispitivane supstance, izvodi se postupak višestepenog ispitivanja korak po korak na životinjama dok ne bude moguće izvršiti nedvosmislenu klasifikaciju.

Validirana metoda ispitivanja jeste metoda ispitivanja kod koje su na osnovu izvršenih studija validacije utvrđeni relevantnost (uključujući i tačnost) i pouzdanost za određenu namenu. Važno je napomenuti da validirana metoda ispitivanja ne mora da ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu tačnosti i pouzdanosti da bi bila prihvatljiva za predloženu namenu.

Kvalitet podataka jeste postupak razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija da se donese i podrži zaključak u pogledu potencijalne opasnosti supstance.

**DODATAK 2.  
SUPSTANCE ZA PROVERU SPOSOBNOSTI ZA IZVOĐENJE METODE ISPITIVANJA BCOP**

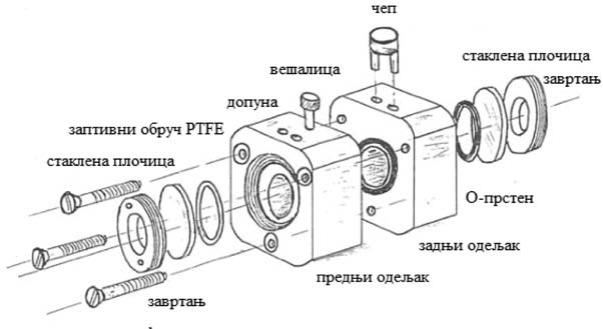
Pre rutinskog korišćenja metode ispitivanja koja ispunjava zahteve ove metode ispitivanja, laboratorije će možda želeti da pokažu tehničku stručnost tako što će pravilno klasifikovati 10 supstanci preporučenih u Tabeli 1. koja je data u ovoj metodi u pogledu njihovog svojstva da izazivaju teško oštećenje oka. Ove supstance su izabrane da predstavljaju opseg odgovora za lokalnu iritaciju/teško oštećenje oka, na osnovu rezultata ispitivanja *in vivo* na oku kunića (TG 405) (tj. kategorije 1, 2A, 2B, ili ne ispunjavaju kriterijume za klasifikaciju i obeležene prema UN GHS**3,7**). Međutim, s obzirom da je potvrđena korisnost ovih ispitivanja (tj. da se identifikuju samo supstance koje izazivaju teško oštećenje/iritaciju oka), postoje samo dva ishoda ispitivanja za svrhu klasifikacije (izazivaju teško oštećenje oka i jako iritativne za oko ili ne izazivaju teško oštećenje oka i nisu jako iritativne) koja pokazuju osposobljenost. Drugi kriterijumi za izbor supstanci bili su da se one mogu naći u prometu, da postoje visokokvalitetni referentni podaci *in vivo*, a postoje i kvalitetni podaci iz dve metode *in vitro* za koje se izrađuju Smernice za ispitivanje. Iz tog razloga, iritativne supstance su izabrane sa preporučenog spiska ICCVAM od 122 referentne supstance za validaciju metoda ispitivanja *in vitro* za utvrđivanje toksičnosti za oko (videti literaturu**5**). Referentni podaci se mogu naći u ranijem pregledu metode ispitivanja BCOP i metode na izolovanom oku pileta (u daljem tekstu: ICE)**17,18**.

Tabela 1. Preporučene supstance za pokazivanje tehničke osposobljenosti za BCOP

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS br. | klasa jedinjenja**[1]** | agregatno stanje | Klasifikacija *In Vivo***[2]** | Klasifikacija *In Vitro***[3]** |
| benzalkonijum hlorid (5%) | 8001-54-5 | Onijum jedinjenje | Tečno | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| hlorheksidin | 55-56-1 | amin, amidin | čvrsto | Kategorija 1 | korozivna/jako iritativna supstanca |
| dibenzoil-L-vinska kiselina | 2743-38-6 | karboksilna kiselina, estar | čvrsto | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| imidazol | 288-32-4 | heterociklično jedinjenje | čvrsto | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| trihlorsirćetna kiselina (30%) | 76-03-9 | karboksilna kiselina | tečno | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| 2,6-dihlorobenzoil hlorid | 4659-45-4 | acil-halogenid | tečno | Kategorija 2A | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| etil-2-metilacetoacetat | 609-14-3 | keton, estar | tečno | kategorija 2B | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| amonijum-nitrat | 6484-52-2 | neorganska so | čvrsto | Kategorija 2A | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| glicerol | 56-81-5 | alkohol | tečno | nije klasifikovana | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| *n*-heksan | 110-54-3 | ugljovodonik (aciklični) | tečno | nije klasifikovana | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| Skraćenice (Chemical Abstracts Service Registry Number, CASRN) **[1]** Hemijske klase su dodeljene svakoj ispitivanoj supstanci koristeći standardnu šemu klasifikacije, na osnovu sistem klasifikacije medicinskog predmetnog registra Nacionalne medicinske biblioteke (dostupan na http://www.nlm.nih.gov/mesh). **[2]** Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem in vivo na oku kunića (OECD TG 405) i koristeći UN GHS**3,7**. **[3]** Na osnovu rezultata u BCOP i ICE. | | | | | |

**DODATAK 3.  
DRŽAČ ROŽNJAČE ZA BCOP**

Držači rožnjače za BCOP izrađeni su od inertnog materijala (npr. polipropilen). Držači se sastoje od dve polovine (prednje i zadnje komore) i imaju dve slična cilindrične unutrašnje komore. Svaka komora ima obim od 5 ml i završava se staklenim prozorom, kroz koji se beleže vrednosti zamućenja. Svaka od unutrašnjih komora ima 1,7 cm u prečniku i duboka je 2,2 cm**1**. O-prsten se nalazi na zadnjoj komori i koristi se za sprečavanje curenja. Rožnjače su postavljene endotelnom stranom na dole na o-prsten zadnjih komora, a prednje komore su postavljene na epitelnu stranu rožnjača. Komore se održavaju na mestu sa po tri šrafa od nerđajućeg materijala koji se nalaze na spoljnim ivicama komore. Na kraju svake komore nalazi se stakleni prozor koji se može ukloniti radi lakšeg pristupa rožnjači. O-prsten se takođe nalazi između stakla prozora i komore kako bi se sprečilo curenje. Dve rupe na vrhu svake komore omogućavaju unošenje i uklanjanje medijuma i ispitivanih jedinjenja. Tokom perioda ispitivanja i inkubacije one su zatvorene gumenim čepovima.



OPACITOMETAR

Opacitometar jeste uređaj za merenje prenosa svetlosti. Svetlo halogene lampe se šalje kroz kontrolni odeljak (prazna komora bez prozora ili tečnosti) u fotoćeliju i upoređuje sa svetlošću koja se šalje kroz eksperimentalni odeljak, u kome se nalazi komora sa rožnjačom, u fotoćeliju. Upoređuje se razlika u prenošenju svetlosti iz fotoćelija i na digitalnom ekranu se prikazuje numerička vrednost zamućenja. Utvrđene su jedinice zamućenja.

Opacitometar obezbeđuje linearni odgovor kroz niz očitavanja zamućenja koji pokrivaju granične tačke koje se koriste za različite klasifikacije opisane Modelom predviđanja (tj. do graničnih tačaka za određivanje teškog oštećenja i jako iritativnog svojstva). Da bi se obezbedila linearna i precizna očitavanja do 75 odnosno 80 jedinica zamućenja, neophodno je da se kalibriše opacitometer koristeći niz kalibratora. Kalibratori (neprozirni listovi od poliestera) se postavljaju u komoru za kalibraciju (komora za rožnjače namenjena da drži kalibratore) i očitavaju na opacitometru. Komora za kalibraciju je namenjena da drži kalibratore na približno istom rastojanju između svetlosti i fotoćelija kao što bi rožnjače bile postavljene tokom merenja zamućenja. Opacitometar se prvo kalibriše na 0 jedinica zamućenja pri čemu se koristi komora za kalibraciju bez kalibratora. Zatim se tri različita kalibratora stavljaju jedan po jedan u komoru za kalibraciju i meri se zamućenje. Kalibratori 1, 2 i 3 pokazuju vrednosti zamućenja koje su jednake njihovim unapred određenim vrednostima od 75, 150, odnosno 225 jedinica zamućenja ± 5%.

**B.48. METODA ISPITIVANJA NA IZOLOVANOM OKU PILETA ZA IDENTIFIKOVANJE HEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKO OŠTEĆENJE OKA I JAKU IRITACIJU OKA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Metoda ispitivanja na izolovanom oku pileta (u daljem tekstu: ICE) je *in vitro* metoda koja se može koristiti pod određenim uslovima i uz određena ograničenja, u cilju klasifikacije supstanci i smeša kao onih koje izazivaju teško oštećenje oka i jaku iritaciju oka**1,2,3**. U ovoj metodi ispitivanja jako iritativne supstance su one supstance koje izazivaju povrede oka koje se kod zamorca zadržavaju najmanje 21 dan nakon primene. Iako ne može u potpunosti da zameni ispitivanje *in vivo* na oku zamorca ICE se preporučuje za upotrebu kao deo višestepene strategije ispitivanja za propisanu klasifikaciju i obeležavanje u okviru posebnog područja primene**4,5**. Ispitivane supstance i smeše6 koje u ovom ispitivanju daju pozitivan rezultat mogu se klasifikovati kao one koje izazivaju teško oštećenje oka ili su jako iritativne bez dodatnog ispitivanja na kuniću. Supstanca sa negativnim rezultatom ispitivanja ispituje se na kuniću korišćenjem strategije višestepenog ispitivanja, koja je definisana u metodi B.5. koja je data u ovom prilogu.

Svrha ove metode ispitivanja je da se opišu postupci koji se koriste za ocenu potencijalnog svojstva ispitivane supstance da izazove teško oštećenje ili jaku iritaciju oka u pogledu njene sposobnosti da u izolovanom oku pileta dovede do pojave toksičnog efekta. Toksični efekti na rožnjaču se mere: 1) kvalitativnim ocenjivanjem zamućenja, 2) kvalitativnim ocenjivanjem oštećenja epitela na osnovu nanošenja fluoresceina na oko (zadržavanje fluoresceina), 3) kvantitativnim merenjem povećane debljine (nadutosti) i 4) kvalitativnim ocenjivanjem makroskopskog morfološkog oštećenja površine. Zamućenje rožnjače, nadutost i procene oštećenja nakon izlaganja ispitivanoj supstanci ocenjuju se pojedinačno, a zatim u kombinaciji, kako bi se izvela klasifikacija prema iritativnosti za oko.

Metodom ICE ispitivane su i supstance iritativne za oko koje izazivaju lezije koje nestaju za manje od 21 dan i supstance koje nisu iritativne. Međutim, preciznost i pouzdanost metode ispitivanja ICE za supstance u ovim kategorijama nisu formalno ocenjene.

*1.2. POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA*

Ova metoda ispitivanja zasniva se na postupku**8** metode ICE Međuagencijskog koordinacionog odbora za validaciju alternativnih metoda (u daljem tekstu: ICCVAM), koji je sačinjen po međunarodnoj validacionoj studiji**4,5,9**, u kojoj su učestvovali Evropski Centar za validaciju alternativnih metoda, Japanski centar za validaciju alternativnih metoda i Odeljenje za toksikologiju i primenjenu farmakologiju holandskog Instituta za istraživanja kvaliteta života (u daljem tekstu: TNO). Postupak se zasniva na informacijama dobijenim iz objavljenih postupaka i sadašnjeg postupka koji koristi TNO**10,11,12,13,14**.

Utvrđena ograničenja za ovu metodu ispitivanja zasnivaju se na velikom udelu lažno pozitivnih rezultata za alkohole i velikom udelu lažno negativnih rezultata za supstance u čvrstom stanju i surfaktante (videti odeljak 2.1. ove metode)**4**. Kada se supstance iz ove klase jedinjenja i agregatnog stanja isključe iz baze podataka, tačnost ICE u sistemima za klasifikaciju EU, ERA i GHS se znatno poboljšava**4**. S obzirom na svrhu ove analize (tj. da se identifikuju samo supstance koje izazivaju teško oštećenje i jaku iritaciju oka), lažno negativni rezultati nisu od ključnog značaja, jer se takve supstance zatim ispituju na kuniću, ili, u zavisnosti od normativnih zahteva, sa drugim odgovarajuće validiranim ispitivanjima *in vitro*, primenom višestepene strategije ispitivanja na osnovu kvaliteta podataka. Osim toga, sadašnja baza podataka za validaciju nije dozvoljavala adekvatnu ocenu nekih klasa jedinjenja ili proizvoda (npr., smeše). Ispitivači mogu razmotriti korišćenje ove metode ispitivanja za ispitivanje svih vrsta materijala (uključujući smeše), pri čemu se pozitivan rezultat prihvata kao pokazatelj supstance koja izaziva teško oštećenje oka ili je jako iritativna za oko. Pozitivni rezultati dobijeni upotrebom alkohola oprezno se tumače zbog opasnosti od precenjivanja.

Kod svih postupaka sa okom pileta poštuju se važeći propisi i procedure za rukovanje materijalom humanog ili životinjskog porekla, u koje spadaju, između ostalog tkiva i tkivne tečnosti. Preporučuju se univerzalne mere predostrožnosti za laboratorije**15**.

Ograničenost ove metode ispitivanja je u tome što iako uzima u obzir neke okularne efekte koji su ocenjeni metodom ispitivanja za određivanje iritacije na oku kunića i u izvesnoj meri njihovu ozbiljnost, ne uzima u obzir oštećenja vežnjače i dužice. Takođe, iako se reverzibilnost oštećenja rožnjače kod metode ICE ne može proceniti sama po sebi, predloženo je, na osnovu studije na oku kunića, da se oceni početna dubina oštećenja rožnjače i tako utvrdi razlika između ireverzibilnih i reverzibilnih efekata**16**. Ispitivanom metodom ICE ne može da se proceni potencijalna sistemska toksičnost u vezi sa izlaganjem preko oka.

Trenutno se preduzimaju napori da se dodatno karakterišu korisnost i ograničenja metode ispitivanja ICE za određivanje slabije iritativnih i supstanci koje nisu iritativne (videti odeljak 2.1. ove metode). Korisnicima se preporučuje da obezbede organizacijama za validaciju uzorke i/ili podatke za formalnu evaluaciju mogućih korišćenja metode ispitivanja ICE u budućnosti, uključujući i za identifikaciju slabije iritativnih i supstanci koje nisu iritativne.

Svaka laboratorija koja ovu metodu uspostavlja po prvi put, koristi hemikalije za proveru sposobnosti date u Dodatku 2. ove metode. Laboratorija može da koristi ove hemikalije da pokaže tehničku kompeticiju za izvođenje metode ICE pre nego što se podaci ICE dostave radi normativne klasifikacije opasnosti.

*1.3. PRINCIP METODE*

Metoda ispitivanja ICE je organotipski model koji obezbeđuje kratkoročno održavanje oka pileta u uslovima *in vitro*. Kod ove metode ispitivanja, oštećenje koje izaziva ispitivana supstanca procenjuje se određivanjem nadutosti rožnjače, zamućenja i zadržavanja fluoresceina. Dok poslednja dva parametra uključuju kvalitativnu procenu, analiza nadutosti rožnjače omogućava kvantitativnu procenu. Svako merenje pretvara se u kvantitativan rezultat koji se koristi za izračunavanje ukupnog indeksa iritacije ili mu se dodeljuje kvalitativna kategorija koja se koristi za klasifikaciju u klasu teško oštećenje oka i jaka iritacija oka *in vitro*. Oba rezultata se mogu koristiti za predviđanje potencijala ispitivane supstance da izazove teško oštećenje ili jaku iritaciju oka *in vivo* (videti Kriterijume za odlučivanje).

**1.3.1. Izvor i starost očiju pilića**

Za ovu analizu obično se koriste oči pilića koji su zaklani u klanicama i namenjeni za ishranu ljudi, čime se eliminiše potreba za laboratorijskim životinjama. Koriste se samo oči zdravih životinja pogodnih za ulazak u lanac ishrane ljudi.

Iako nije sprovedena kontrolisana studija za procenu optimalne starosti pileta, u ovoj metodi ispitivanja koriste se mladi pilići starosti i telesne mase kakvi se obično obrađuju u živinarskim klanicama (tj. pilići stari približno 7 nedelja telesne mase 1,5 kg do 2,5 kg).

**1.3.2. Sakupljanje i transport očiju u laboratoriju**

Glave se uklanjaju neposredno po omamljivanju pilića, obično strujnim udarom i zasecanjem vrata radi iskrvavljenja. Trebalo da bude lociran lokalni izvor pilića (u blizini laboratorije) tako da njihove glave mogu da se prenesu iz klanice u laboratoriju dovoljno brzo kako bi se svelo na minimum propadanje i/ili kontaminacija bakterijama. Vremenski razmak između sakupljanja pilećih glava i upotrebe očiju u metodi ispitivanja ICE svodi se na minimum (obično u roku od dva sata), kako se ne bi umanjila vrednost rezultata ispitivanja. Ovi rezultati su zasnovani na kriterijumima za izbor očiju i odgovorima pozitivnih i negativnih kontrola. Sve oči upotrebljene u ispitivanju pripadaju istoj grupi očiju sakupljenoj u određenom danu.

Pošto se oči seciraju u laboratoriji, intaktne glave se transportuju iz klanice na sobnoj temperaturi u plastičnim kutijama i navlažene ubrusima natopljenim izotoničnim fiziološkim rastvorom.

**1.3.3. Kriterijumi za izbor za očiju koje se koriste u ICE**

Oči koje imaju visoku baznu liniju bojenja fluorescinom (tj. > 0,5) ili skor zamućenja rožnjače (tj. > 0,5) odbacuju se nakon izolacije.

Svaka ispitivana grupa i paralelna pozitivna kontrola se sastoji od najmanje tri oka. Za negativnu kontrolnu grupu ili kontrolu rastvarača (ako se umesto fiziološkog rastvora koristi neki drugi rastvarač) koristi se najmanje jedno oko.

*1.4. POSTUPAK*

**1.4.1. Priprema oka**

Očni kapci se pažljivo isecaju, vodeći računa da se ne oštetiti rožnjača. Celovitost rožnjače se brzo ocenjuje tako što se na njenu površinu na nekoliko sekundi nanese kap 2% (w/v) natrijum fluoresceina, a zatim se ispere izotoničnim fiziološkim rastvorom. Oči tretirane fluoresceinom se zatim pregledaju mikroskopom sa slit-lampom kako bi se proverilo da li je rožnjača neoštećena (tj. zadržavanje fluoresceina i skor zamućenje rožnjače mora biti ≤ 0,5).

Ako je neoštećeno oko se zatim iseca iz lobanje, vodeći računa da se ne oštetiti rožnjača. Očna jabučica se povuče iz očne duplje tako da se trepavica čvrsto uhvati hirurškom pincetom, i očni mišići iseku savijenim makazama sa tupim vrhom. Važno je da se izbegne oštećenje rožnjače zbog prekomernog pritiska (tj. predmeta za stezanje).

Kada se oko izvadi iz očne duplje, vidljivi deo optičkog nerva ostaje spojen. Kada se izvadi iz očne duplje, oko se stavlja na upijajuću podlogu, a treći očni kapak i drugo vezivno tkivo se odseku.

Izvađeno oko stavlja se u stezaljku od nerđajućeg čelika sa rožnjačom u vertikalnom položaju. Stezaljka se prenese u komoru uređaja za superfuziju**16**. Stezaljka je postavljena u uređaj za superfuziju tako da je cela rožnjača snabdevena kapima fiziološkog rastvora. Temperatura u komorama uređaja za superfuziju je kontrolisana na 32° C ± 1,5° C. U Dodatku 3. ove metode dat je dijagram tipičnog uređaja za superfuziju i stezaljke za oko, koji se mogu naći na tržištu ili napraviti. Uređaj se može prilagoditi potrebama pojedinih laboratorija (npr. da se napravi mesta za različit broj očiju).

Nakon što se stave u uređaj za superfuziju, oči se ponovo ispituju mikroskopom sa slit-lampom kako bi se proverilo da nisu oštećene tokom postupka seciranja. Debljina rožnjače se meri i u ovoj fazi na najvišoj tački rožnjače elementom za merenje dubine na mikroskopu sa slit-lampom. Zamenjuju se oči sa 1) skorom zadržavanja fluoresceina > 0,5; 2) zamućenja rožnjače > 0,5 ili 3) bilo kakvim dodatnim znacima oštećenja. Od očiju koje se ne odbace na osnovu bilo kojeg od ovih kriterijuma, odbacuju se pojedinačne oči sa rožnjačom čija debljina odstupa više od 10% od srednje vrednosti za sve oči. Mikroskopi sa slit-lampom mogu da pokažu različite vrednosti debljine rožnjače ako je širina proreza drugačije podešena. Širina proreza je podešena na 0,095 mm.

Kada se sve oči ispitaju i odobre, oči se inkubiraju od 45 minuta do 60 minuta da se pre primena doze dovedu u ravnotežu sa sistemom za ispitivanje. Nakon perioda uravnotežavanja, kao bazna linija za debljinu i zamućenje rožnjače beleži se nulta referentna vrednost (tj. vreme = 0). Skor fluorescina određen pri seciranju koristi se kao bazna linija za taj efekat.

**1.4.2. Primena ispitivane supstance**

Odmah nakon merenja nultih referentnih vrednosti, oko (u svom držaču) se uklanja iz uređaja za superfuziju, stavlja u horizontalan položaj, a ispitivana supstanca se nanosi na rožnjaču.

Ispitivane supstance u tečnom stanju se obično ispituju nerazblažene, ali po potrebi mogu da se razblaže (npr. kao deo dizajna ispitivanja). Najpogodniji kao rastvarač za razblažene supstance je fiziološki rastvor. Međutim, pod kontrolisanim uslovima mogu da se koriste i alternativni rastvarači, ali se prikazuje i prikladnost rastvarača, osim fiziološkog rastvora.

Ispitivane supstance u tečnom stanju nanose se na rožnjaču tako što se celokupna površina rožnjače ravnomerno prekrije ispitivanom supstancom; standardna zapremina je 0,03 mL.

Ako je moguće, supstance u čvrstom stanju se usitnjavaju što je više moguće tučkom u avanu ili sličnim sredstvom za drobljenje. Prašak se nanosi na rožnjaču tako da površina bude ravnomerno prekrivena ispitivanom supstancom; standardna količina je 0,03 g.

Ispitivana supstanca (u tečnom ili čvrstom stanju) ostavi se da deluje 10 sekundi, a zatim se ispere iz oka fiziološkim rastvorom (oko 20 mL) na sobnoj temperaturi. Oko (u držaču) se potom vrati u uređaj za superfuziju u prvobitni uspravni položaj.

**1.4.3. Kontrole**

Svaki eksperiment obuhvata paralelnu negativnu kontrolu ili kontrolu rastvarača/nosača i pozitivne kontrole.

Pri ispitivanju supstanci u tečnom stanju u koncentraciji 100% ili čvrstih supstanci, fiziološki rastvor se koristi kao paralelna negativna kontrola u metodi ICE da se otkriju nespecifične promene u sistemu za ispitivanje i da se proveri da li uslovi ispitivanja prouzrokuju iritativni odgovor.

Prilikom ispitivanja razblaženih tečnih hemikalija, u ispitivanje se uključuje paralelna kontrolna grupa rastvarača/nosača, da se otkriju nespecifične promene u sistemu za ispitivanje i da se proveri da li uslovi ispitivanja uzrokuju iritativni odgovor. Može se koristiti samo rastvarač/nosač za koji je dokazano da nema štetnih efekata na sistem za ispitivanje.

U svako ispitivanje, kao paralelna pozitivna kontrola, uključuju se supstance poznate kao iritativne za oko kako bi se proverilo da li dolazi do očekivanog odgovora. Kako se ICE koristi u ovoj metodi ispitivanja da se identifikuju supstance koje izazivaju teško oštećenje oka ili jaku iritaciju, pozitivna kontrola je referentna supstanca koja u ovoj metodi ispitivanja izaziva jak odgovor. Da bi se obezbedilo da varijabilnost u odgovoru pozitivne kontrole može da se ocenjuje u daljem vremenskom periodu, stepen jačine odgovora ne sme biti preteran. Za pozitivnu kontrolu se sakuplja dovoljno podataka *in vitro* kako bi se mogao izračunati statistički definisan prihvatljiv raspon pozitivne kontrole. Ako za određenu pozitivnu kontrolu ne postoje odgovarajuće podaci dobijeni metodom ICE iz ranijih ispitivanja, sprovode se studije u kojima će se ovi podaci prikupiti.

Primeri pozitivnih kontrola za ispitivane supstance u tečnom stanju su 10%-tna sirćetna kiselina ili 5%-tni benzalkonijum hlorid, dok su primeri pozitivne kontrole za ispitivane supstance u čvrstom stanju natrijum hidroksid ili imidazol.

Referentne supstance su pogodne za ocenu potencijala iritativnosti za oko koji nepoznate hemikalije specifične klase jedinjenja ili proizvoda imaju, ili za ocenu relativnog iritativnog potencijala iritanasa za oko u određenom opsegu iritativnih odgovora.

**1.4.4. Merenje efekata**

Tretirane rožnjače se evaluiraju pre ispitivanja i sa početkom u 30, 75, 120, 180 i 240 minuta (± 5 minuta) po ispiranju koje se vrši nakon tretmana. Ovi vremenski intervali obezbeđuju adekvatan broj merenja tokom četvorosatnog tretmana i ostavljaju dovoljno vremena između merenja da se sprovedu neophodna posmatranja svih očiju.

Efekti koji se evaluiraju su zamućenje rožnjače, nadutost, zadržavanje fluoresceina, i morfološki efekti (npr. udubljivanje ili opuštanje epitela). Svi efekti, izuzev zadržavanja fluoresceina (što se određuje samo pre tretmana i 30 minuta posle izlaganja ispitivanoj supstanci) određuju se u svakom od gore navedenih vremenskih intervala.

Preporučuje se fotografisanje radi dokumentovanja zamućenja rožnjače, zadržavanja fluoresceina, morfoloških efekata i, ako se sprovodi, histopatologija.

Posle završnog pregleda nakon četiri sata, preporučuje se da korisnici čuvaju oči u odgovarajućem fiksativu (npr. neutralni puferovani formalin) za eventualno histopatološko ispitivanje.

Nadutost rožnjače se određuje merenjem debljine rožnjače optičkim pahimetrom na mikroskopu sa slit-lampom. Izražava se kao procenat i izračunava se na osnovu merenja debljine rožnjače prema sledećoj formuli:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ( | debljina rožnjače u vremenu *t* - debljina rožnjače u vremenu = 0 | ) | x 100 |
| debljina rožnjače u vremenu = 0 |

Srednji procenat nadutosti rožnjače za sve ispitivane oči računa se za svako vreme posmatranja. Na osnovu najvišeg srednjeg skora nadutosti rožnjače, koja je zabeležena u bilo koje vreme, za svaku ispitivanu supstancu određuje se ukupni skor za kategoriju.

Kod procenjivanja zamućenja rožnjače koristi se površina rožnjače koja je najmanje zamućena. Srednja vrednost zamućenja rožnjače za sve ispitivane oči izračunava se za svako vreme posmatranja. Na osnovu najvišeg srednjeg skora zamućenja rožnjače, koji je zabeležen u bilo koje vreme, za svaku ispitivanu supstancu određuje se ukupni skor kategorije (Tabela 1).

Tabela 1. Skorovi zamućenja rožnjače

|  |  |
| --- | --- |
| Skor | Zapažanje |
| 0 | Nije zamućena |
| 0,5 | veoma malo zamućena |
| 1 | Rasute ili difuzne oblasti; delovi dužice su jasno vidljivi |
| 2 | lako uočljiva oblast koja propušta svetlost; delovi dužice malo mutni |
| 3 | Veoma zamućena rožnjača; nisu vidljivi specifični delovi dužice, veličina zenice se jedva raspoznaje |
| 4 | Potpuna zamućenje rožnjače; dužica se ne vidi |

Srednja vrednost zadržavanja fluoresceina za sve ispitivane oči se izračunava samo za vreme posmatranja od 30 minuta i za svaku ispitivanu supstancu se dodeljuje kao ukupni skor kategorije (Tabela 2).

Tabela 2. Skorovi zadržavanja fluoresceina

|  |  |
| --- | --- |
| Skor | Zapažanje |
| 0 | Bez zadržavanja fluoresceina |
| 0,5 | Veoma mala obojenost pojedinačnih ćelija |
| 1 | Obojenost pojedinih ćelija rasutih širom tretirane oblasti rožnjače |
| 2 | Fokusna ili konfluentna obojenost pojedinih ćelija |
| 3 | Velike slivene oblasti rožnjače u kojima se zadržava fluorescein |

Morfološki efekti uključuju udubljivanje epitelnih ćelija rožnjače, opuštanje epitela, hrapavljenje površine rožnjače i lepljenje ispitivane supstance za rožnjaču. Ovi nalazi mogu da variraju u jačini i mogu se pojaviti istovremeno. Klasifikovanje ovih nalaza je subjektivno u zavisnosti od tumačenja ispitivača.

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

**2.1. Ocenjivanje podataka**

Rezultati za zamućenje rožnjače, nadutost i zadržavanje fluoresceina posebno se ocenjuju da se formira klasa ICE za svaki efekat. Klase ICE za svaki efekat se zatim kombinuju da daju klasifikaciju na osnovu iritativnosti za svaku ispitivanu supstancu.

**2.1. Kriterijumi za odlučivanje**

Kada se evaluiraju svi efekti, na osnovu unapred utvrđenih opsega mogu se dodeliti klase ICE. Debljina rožnjače (Tabela 3), zamućenje (Tabela 4) i zadržavanje fluoresceina (Tabela 5) tumače se pomoću četiri ICE klase prema sledećim skalama:

Tabela 3. Kriterijumi za ICE klasifikaciju debljine rožnjače

|  |  |
| --- | --- |
| Srednja nadutost rožnjače (%) **[\*]** | Klasa ICE |
| 0 do 5 | I |
| > 5 do 12 | II |
| > 12 do 18 (> 75 min posle tretmana) | II |
| > 12 do 18 (≤ 75 min posle tretmana) | III |
| > 18 do 26 | III |
| > 26 do 32 (> 75 min posle tretmana) | III |
| > 26 do 32 (≤ 75 min posle tretmana) | IV |
| > 32 | IV |
| **[\*]** Skorovi nadutosti rožnjače su primenljivi samo ako je merenje izvršeno pomoću mikroskopa sa Haag-Streit BP900 slit lampom, sa elementom za merenje dubine No I podešavanjem širine 9½ (0,095 mm). Mikroskopi sa ovakvom lampom mogu dati različite rezultate merenja za debljinu rožnjače ako je slit širina drugačije podešena. | |

Tabela 4. Kriterijumi za ICE klasifikaciju zamućenja

|  |  |
| --- | --- |
| Srednji najviši skor zamućenja **[\*]** | Klasa ICE |
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-4,0 | IV |
| **[\*]** Videti Tabelu 1. | |

Tabela 5. Kriterijumi za ICE klasifikaciju srednji skor zadržavanja fluoresceina

|  |  |
| --- | --- |
| Srednji skor zadržavanja fluoresceina 30 minuta posle tretmana **[\*]** | Klasa ICE |
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-3,0 | IV |
| **[\*]** Videti Tabelu 2. | |

Opšta klasifikacija ispitivanih supstanci za iritativnost *in vitro* procenjuje se očitavanjem klasifikacije iritativnosti koja odgovara kombinaciji kategorija dobijenih za nadutost rožnjače, zamućenje rožnjače i zadržavanje fluoresceina i upotrebom formula iz Tabele 6.

Tabela 6. Ukupna klasifikacija za iritativnost *in vitro*

|  |  |
| --- | --- |
| Klasifikacija | Kombinacije tri efekta |
| Teško oštećenje oka/jaka iritacija oka | 3 × IV 2 × IV, 1 × III  2 × IV, 1 × II **[\*]** 2 × IV, 1 × I **[\*]** zamućenje rožnjače ≥ 3 na 30 minuta (u najmanje 2 oka)  zamućenje rožnjače = 4 u bilo koje vreme (kod najmanje 2 oka)  Ozbiljno opuštanje epitela (kod najmanje 1 oka) |
| **[\*]** Manja verovatnoća da će se ovi efekti kombinovati | |

Kao što je navedeno u odeljku 1.2. ove metode ako ispitivana supstanca nije identifikovana kao ona koja izaziva teško oštećenje ili jaku iritaciju oka, vrši se dodatno ispitivanje radi klasifikacije i obeležavanja. U primerima sa podacima iz metode *in vivo* na oku kunića za određivanje supstanci koje izazivaju teško oštećenje oka i koje su jaki iritansi za oko, klasifikovanih prema sistemima klasifikacije ERA**1**, EU**2**, ili GHS**3**, ukupna tačnost metode ispitivanja ICE je 83% (120/144) do 87% (134/154), udeo lažno pozitivnih rezultata 6% (7 / 122) do 8% (9 /116), a lažno negativnih rezultata 41% (13/32) do 50% (15/30). Kada se iz baze podataka isključe supstance iz određenih klasa jedinjenja (tj. alkoholi i surfaktanti) i agregatnih stanja (npr. čvrsto stanje), tačnost ispitivanja ICE prema sistemima klasifikacije EU, ERA i GHS kreće se od 91% (75/82) do 92% (69/75), udeo lažno pozitivnih rezultata kreću se od 5% (4/73) do 6% (4/70), a lažno negativnih kreće se od 29% (2/7) do 3% (3/9)**4**.

Čak i ako se supstance ne mogu klasifikovati u klasu teškog oštećenja oka ili jake iritacije oka, podaci dobijeni sa ICE u kombinaciji sa podacima iz ispitivanja *in vivo* na oku kunića ili odgovarajuće validiranim ispitivanjem *in vitro* korisni za dalju evaluaciju korisnosti i ograničenja metode ICE za utvrđivanje manje iritativnih i supstanci koje nisu iritativne (Smernice za upotrebu metoda ispitivanja *in vitro* za određivanje toksičnosti za oko su u pripremi).

**2.2. Kriterijumi za prihvatljivost studije**

Ispitivanje se smatra prihvatljivim ako paralelne negativne ili kontrole nosača/rastvarača i paralelne pozitivne kontrole daju klasifikaciju iritativnosti u nije iritativno, odnosno teško oštećenje/jaka iritacija oka.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o (ako su relevantni za sprovođenje studije):

1) Ispitivanim i kontrolnim supstancama:

- hemijski naziv, npr. naziv iz nomenklature IUPAC ili CAS naziv i CAS broj, ako su poznati;

- registarski broj (RN) CAS, ako je poznat;

- čistoća i sastav supstanci ili smeša (u masenim procentima), ako je takva informacija dostupna;

- fizičko-hemijska svojstva, relevantna za sprovođenje studije, npr. agregatno stanje, isparljivost, pH vrednost, stabilnost, klasa jedinjenja, rastvorljivost u vodi;

- obrada ispitivanih/kontrolnih supstanci pre ispitivanja, ako je potrebno (npr. zagrevanje, usitnjavanje);

- stabilnost, ako je poznata.

2) Sponzoru i ispitivanoj laboratoriji:

- ime i adresa sponzora, ispitivane laboratorije i rukovodioca studije;

- podaci o izvoru očiju (npr. objekat iz koga su prikupljene);

- skladištenje i uslovi transporta očiju (npr. datum i vreme sakupljanja očiju, vremenski interval pre početka ispitivanja);

- ako je moguće, posebne karakteristike životinja od kojih su sakupljene oči (npr. starost, pol, telesna masa životinje davaoca).

3) Opravdanosti metode ispitivanja i postupak koji je korišćen.

4) Integritetu metode ispitivanja:

- postupak da se obezbedi ispravnost (tj. tačnost i pouzdanost) metode ispitivanja u tokom vremena (npr. periodična ispitivanja supstanci za proveru sposobnosti, korišćenje podataka o negativnim i pozitivnim kontrolama iz ranijih ispitivanja).

5) Kriterijumima za prihvatanje ispitivanja:

- ako je primenljivo, prihvatljivi opsezi referentne kontrole na osnovu podataka iz ranijih ispitivanja.

6) Uslovima ispitivanja:

- opis korišćenog sistema za ispitivanje;

- korišćeni mikroskop sa slit-lampom (npr, model);

- podešavanja za mikroskop sa slit-lampom;

- podaci o upotrebljenim očima pilića, uključujući izjave o njihovom kvalitetu;

- detalji o korišćenom postupku ispitivanja;

- korišćene koncentracije ispitivanih supstanci;

- opis svake izmene postupka ispitivanja;

- pozivanje na podatke iz ranijih ispitivanja modela (tj. negativnih i pozitivnih kontrola, supstance za proveru sposobnosti, referentne supstance);

- opis korišćenih kriterijuma za evaluaciju;

7) Rezultatima:

- opis drugih primećenih efekata;

- po potrebi, fotografije oka.

8) Tumačenju rezultata.

9) Zaključcima.

**4. LITERATURA**

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

2. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.

3. United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\_rev02/02files\_e.html

4. ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_tmer.htm

5. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

6. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.

7. OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en\_2649\_34377\_37051368\_1\_1\_1\_1,00.html

8. ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_tmer.htm

9. ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_ice.htm

10. Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. Fd. Chem. Toxicol. 31:69-76.

11. INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm

12. Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In Vitro 9:871-929.

13. Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. Food Chem. Toxicol. 34:291-296.

14. Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. Food Chem. Toxicol. 35:23-37.

15. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf

16. Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36:106-117.

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

18. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_bcop.htm

19. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\_brd\_bcop.htm

**Deo drugi**

**DODATAK 1.**

DEFINICIJE

Tačnost jeste stepen ujednačenosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrednosti. Merilo je karakteristika metode ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Ovaj termin se često koristi u istom značenju kao "usklađenost" kako bi se označio udeo tačnih rezultata metode ispitivanja.

Referentna supstanca jeste supstanca koja se koristi kao standard za poređenje sa ispitivanom supstancom. Referentna supstanca ima sledeća svojstva: 1) stalan i pouzdan izvor; 2) strukturnu i funkcionalnu sličnost sa klasom jedinjenja koje se ispituje; 3) poznata fizička/hemijska svojstva; 4) podatke o poznatim efektima i 5) poznati potencijal u opsegu očekivanog odgovora.

Rožnjača jeste prozirni deo prednjeg dela očne jabučice koji pokriva vežnjaču i dužicu i propušta svetlost u unutrašnjost.

Zamućenje rožnjače jeste mera obima zamućenosti rožnjače nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Povećano zamućenje rožnjače ukazuje na oštećenje rožnjače. Zamućenje se može evaluirati subjektivno kao kod Drajzeove metode na oku kunića, ili objektivno pomoću instrumenta kao što je opacitometar.

Nadutost rožnjače jeste objektivno merenje u metodi ICE, da se utvrdi stepen nadutosti rožnjače nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Izražava se u procentima i izračunava se od bazne linije (vrednosti pre nanošenja) izmerenih vrednosti debljine rožnjače i debljina zabeleženih u ispitivanju ICE u redovnim intervalima nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji. Stepen nadutosti rožnjače ukazuje na oštećenje rožnjače.

ERA kategorija 1 jeste korozivno (ireverzibilno uništavanje tkiva oka) koje oštećuje rožnjaču ili izaziva iritaciju koja se održava više od 21 dan**1**.

EU kategorija R41 jeste oštećenje tkiva oka, ili ozbiljno fizičko propadanje vida, nakon nanošenja ispitivane supstance na prednju površinu oka, koja nije u potpunosti reverzibilna u roku od 21 dana od primene**2**.

Udeo lažno negativnih jeste udeo svih pozitivnih supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao negativne. Jedan je od pokazatelja karakteristika metode ispitivanja.

Udeo lažno pozitivnih jeste udeo svih negativnih supstanci koje su metodom ispitivanja pogrešno identifikovane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja karakteristika metode ispitivanja.

Zadržavanje fluoresceina jeste subjektivno merenje pri ispitivanju ICE u kojem se određuje stepen natrijum fluorescina koji se zadržava u epitelnim ćelijama u rožnjači nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Stepen zadržavanja fluoresceina ukazuje na oštećenje epitela rožnjače.

GHS jeste Globalno harmonizovani sistem za klasifikaciju i obeležavanje hemikalija odnosno sistem koji predlaže klasifikaciju hemikalija (supstanci i smeša) prema standardizovanim vrstama i nivoima fizičkih opasnosti i opasnosti po zdravlje ljudi i životnu sredinu, koji obuhvata i odgovarajuće elemente komunikacije, kao što su: piktogrami, znakovi opasnosti, pisana upozorenja, oznake rizika i bezbednosti, i bezbednosni listovi, da bi se prenela informacija o njihovim štetnim efektima sa ciljem da se zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prevoznike, potrošače i pružaoce pomoći u vanrednim situacijama) i životna sredina**3**.

GHS kategorija 1 jeste oštećenje tkiva oka, ili ozbiljno fizičko propadanje vida, nakon nanošenja ispitivane supstance na prednju površinu oka, koja nije potpuno reverzibilna u roku od 21 dana od primene**3**.

Opasnost jeste svojstvo agensa ili situacije koje može da dovede do štetnih efekata kada su organizam, sistem ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Negativna kontrola jeste netretirani uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje. Ovaj uzorak se obrađuje sa uzorcima tretiranim ispitivanom supstancom i drugim kontrolnim uzorcima da utvrdi ima li interakcije između rastvarača i sistema za ispitivanje.

Hemikalija koja nije iritativna jesu supstance koje nisu klasifikovane kao supstance iritativne za oko ERA kategorije 1, 2, ili 3 EU kategorije R41 ili R36; ili GHS kategorije 1, 2A ili 2B.

Hemikalija koja izaziva teško oštećenje oka jeste: a) supstanca koja izaziva ireverzibilno oštećenje tkiva oka; b) supstance koje su klasifikovane kao iritativne za oko GHS kategorije 1, ERA kategorije I ili EU kategorije R41**1,2,3**.

Iritativno za oko jeste: a) supstanca koja dovodi do reverzibilne promene u oku nakon nanošenja na prednju površinu oka; b) supstance koje su klasifikovane kao supstance iritativne za oko ERA kategorije II ili III, EU kategorije R36 ili GHS kategorije 2A ili 2B**1,2,3**.

Jako iritativno za oko jeste: a) supstanca koja izaziva oštećenje tkiva oka nakon nanošenja na prednju površinu oka koje se ne povlači u roku od 21 dana od dana nanošenja ili izaziva ozbiljno fizičko propadanje vida, b) supstance koje su klasifikovane kao supstance iritativne za oko GHS kategorije 1, ERA kategorije I ili EU kategorije R41**1,2,3**.

Pozitivna kontrola jeste uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje i koji se tretira supstancom za koju se zna da izaziva pozitivni odgovor. Da bi se obezbedilo da varijabilnost u odgovoru pozitivne kontrole može da se ocenjuje tokom vremena, jačina odgovora ne sme da bude preterana.

Pouzdanost pokazuje u kojoj meri metoda ispitivanja može da se ponavlja unutar jedne laboratorije i između više laboratorija tokom vremena uz primenu istog postupka. Ocenjuje se izračunavanjem ponovljivosti unutar jedne laboratorije i između više laboratorija.

Mikroskop sa slit-lampom jeste instrument koji se koristi za direktno ispitivanje oka pod uvećanjem binokularnog mikroskopa stvaranjem stereoskopske, uspravne slike. U metodi ispitivanja ICE, ovaj instrument se koristi za pregled prednjih struktura oka pileta, kao i da se objektivno izmeri debljina rožnjače sa dodatkom za merenje dubine.

Kontrola rastvarača/nosača jeste netretirani uzorak koji sadrži sve komponente sistema za ispitivanje, uključujući rastvarač ili nosač koji se obrađuje sa uzorcima tretiranim ispitivanom supstancom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila bazna linija odgovora za uzorke tretirane ispitivanom supstancom rastvorenom u tom rastvaraču ili nosaču. Kada se ispituje sa paralelnom negativnom kontrolom, ovaj uzorak pokazuje i da li rastvarač ili nosač reaguje sa sistemom za ispitivanje.

Višestepeno ispitivanje jeste strategija ispitivanja korak po korak gde se određenim redosledom pregledaju sve postojeće informacije o ispitivanoj supstanci, pri čemu se na svakom stepenu koristi postupak procene kvaliteta podataka da bi se utvrdilo da li postoji dovoljno informacija za odluku o klasifikovanju supstance kao opasne, pre prelaska na sledeći stepen. Ako se na osnovu postojećih informacija može pripisati iritativni potencijal ispitivanoj supstanci, nije potrebno dodatno ispitivanje. Ako se na osnovu postojećih informacija ne može pripisati iritativni potencijal ispitivane supstance, izvodi se postupak višestepenog ispitivanja korak po korak na životinjama dok ne bude moguće izvršiti nedvosmislenu klasifikaciju.

Validirana metoda ispitivanja jeste metoda ispitivanja kod koje su na osnovu izvršenih studija validacije utvrđeni relevantnost (uključujući i tačnost) i pouzdanost za određenu namenu. Važno je napomenuti da validirana metoda ispitivanja ne mora da ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu tačnosti i pouzdanosti da bi bila prihvatljiva za predloženu namenu.

Kvalitet podataka jeste postupak razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija da se donese i podrži zaključak u pogledu potencijalne opasnosti supstance.

**DODATAK 2.  
SUPSTANCE ZA PROVERU SPOSOBNOSTI ZA IZVOĐENJE METODE ISPITIVANJA ICE**

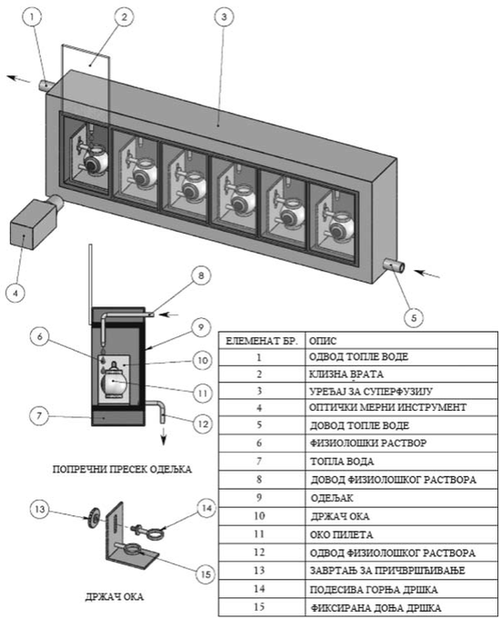
Pre rutinskog korišćenja metode ispitivanja koja ispunjava zahteve ove metode ispitivanja, laboratorije će možda želeti da pokaže tehničku stručnost tako što će pravilno klasifikovati 10 supstanci preporučenih u Tabeli 1. koja je data u ovoj metodi u pogledu njihovog svojstva da izazivaju teško oštećenje oka. Ove supstance su izabrane da predstavljaju opseg odgovora za lokalnu iritaciju/teško oštećenje oka, na osnovu rezultata ispitivanja *in vivo* na oku kunića (Uputstvo za ispitivanje OECD 405) (tj. kategorije 1, 2A, 2B, ili neklasifikovane i obeležene prema UN GHS**3,7**. S obzirom da je potvrđena korisnost ovih ispitivanja (tj. da se identifikuju samo supstance koje izazivaju teško oštećenje/iritaciju oka), postoje samo dva ishoda ispitivanja u svrhu klasifikacije (izazivaju teško oštećenje oka i jako iritativne za oko ili ne izazivaju teško oštećenje oka i nisu jako iritativne) koja pokazuju osposobljenost. Drugi kriterijumi za izbor supstanci bili su da se one mogu naći u prometu, da postoje visokokvalitetni referentni podaci *in vivo*, a postoje i kvalitetni podaci iz dve metode *in vitro* za koje se izrađuju Smernice za ispitivanje. Iz tog razloga, iritativne supstance su izabrane sa preporučenog spiska ICCVAM od 122 referentne supstance za validaciju metoda ispitivanja *in vitro* za utvrđivanje toksičnosti za oko (videti literaturu**5**). Referentni podaci se mogu naći u ranijem pregledu metode ispitivanja BCOP i metode na izolovanom oku pileta (ICE)**18,19**.

Tabela 1. Preporučene supstance za pokazivanje tehničke osposobljenosti za ICE

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Supstanca | CAS br. | klasa jedinjenja **[1]** | agregatno stanje | Klasifikacija *In Vivo* **[2]** | Klasifikacija *In Vitro***[3]** |
| benzalkonijum hlorid (5%) | 8001-54-5 | onijum jedinjenje | Tečno | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| hlorheksidin | 55-56-1 | amin, amidin | čvrsto | Kategorija 1 | korozivna/jako iritativna supstanca |
| dibenzoil-L-vinska kiselina | 2743-38-6 | karboksilna kiselina, estar | čvrsto | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| imidazol | 288-32-4 | heterociklično jedinjenje | čvrsto | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| trihlorsirćetna kiselina (30%) | 76-03-9 | karboksilna kiselina | tečno | Kategorija 1 | teško oštećenje oka/jako iritativno za oko |
| 2,6-dihlorobenzoil hlorid | 4659-45-4 | acil-halogenid | tečno | Kategorija 2A | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| etil-2-metilacetoacetat | | 609-14-3 | keton, estar | tečno | Kategorija 2B | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| amonijum-nitrat | 6484-52-2 | neorganska so | čvrsto | Kategorija 2A | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| glicerol | 56-81-5 | alkohol | tečno | nije klasifikovana | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| n-heksan | 110-54-3 | ugljovodonik (aciklični) | tečno | nije klasifikovana | ne izaziva teško oštećenje oka/ ni jaku iritaciju oka |
| Skraćenice (Chemical Abstracts Service Registry Number, CASRN): **[1]** Hemijske klase su dodeljene svakoj ispitivanoj supstanci koristeći standardnu šemu klasifikacije, na osnovu sistem klasifikacije medicinskog predmetnog registra Nacionalne medicinske biblioteke (dostupan na http://www.nlm.nih.gov/mesh). **[2]** Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem in vivo na oku kunića (OECD TG 405) i koristeći UN GHS**3,7**. **[3]** Na osnovu rezultata u BCOP i ICE. | | | | | |

**DODATAK 3.  
DIJAGRAMI UREĐAJA ZA SUPERFUZIJU KOJI SE KORISTI U METODI ICE I STEZALJKE ZA OKO**

Za dodatne generičke opise uređaja za superfuziju i stezaljke za oko videti literaturu**17**.



**Prilog 3.**

**Metode ispitivanja svojstava hemikalija koja utiču na životnu sredinu**

**C.1. AKUTNA TOKSIČNOST PO RIBE**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Svrha ove metode je da se za ispitivanu supstancu utvrdi letalna akutna toksičnost po slatkovodne ribe. U ispitivanju se koristi sistem (statički, polustatički ili protočni) koji je najprikladniji za konstantno održavanje ispitivanih koncentracija supstance u vodi. Izbor je olakšan kada se raspolaže podacima o rastvorljivosti u vodi, naponu pare, hemijskoj stabilnosti, konstantama disocijacije i biorazgradljivosti supstance.

Dodatne podatke (npr. podaci o strukturnoj formuli, stepenu čistoće, vrsti i procentu značajnih nečistoća, prisustvu i količini aditiva, koeficijent raspodele u sistemun-oktanol/voda) uzeti u obzir pri planiranju ispitivanja i pri tumačenju dobijenih rezultata.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Akutna toksičnost jeste vidljivi štetan efekat koji nastaje u organizmu usled izlaganja supstanci u toku kratkog vremenskog perioda (dani). U ispitivanju, akutna toksičnost izražava se kao srednja letalna koncentracija (u daljem tekstu: LC50), odnosno koncentracija supstance u vodi koja dovodi do smrti 50% jedinki ispitivane grupe riba, koje su neprekidno izložene u toku unapred naznačenog vremenskog perioda.

Sve koncentracije supstanci koje se ispituju izražavaju se u jedinicama mase po zapremini (mg/l) ili u masenim koncentracijama (mg/kg).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Na osnovu rezultata ispitivanja sa referentnom supstancom može da se utvrdi da li je u laboratorijskim uslovima ispitivanja došlo do značajne promene osetljivosti vrste na kojoj se vrši ispitivanje.

Za ovu metodu ispitivanja nisu propisane referentne supstance.

*1.4. PRINCIP METODE*

Preliminarno ispitivanje supstance vrši se za koncentraciju od 100 mg/l, kako bi se utvrdilo da je vrednost LC50 viša od ove koncentracije.

Ispitivanje traje 96 sati. U toku ovog vremena ribe se izlažu ispitivanoj supstanci koja se dodaje u vodu u opsegu koncentracija. Na najmanje svaka 24 sata, beleži se smrtnost riba i pritom se, kad god je moguće, izračunava vrednost LC50.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Kriterijumi kvaliteta primenjuju se na čitavu metodu ispitivanja, uključujući i preliminarno ispitivanje.

Na kraju ispitivanja smrtnost u kontrolnim grupama ne sme da prelazi 10% (ili više od jedne ribe u kontrolnoj grupi sa manje od 10 jedinki).

U toku čitavog ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi je viša od 60% zasićenja.

U toku trajanja ispitivanja, koncentracije ispitivane supstance održavati u granicama od 80% od početnih koncentracija.

Za supstance koje se lako rastvaraju u ispitivanom medijumu i obrazuju stabilne rastvore, odnosno rastvore koji u znatnoj meri ne isparavaju, ne raspadaju se, ne podležu hidrolizi ili se ne adsorbuju, može se uzeti da je početna koncentracija jednaka nominalnoj koncentraciji. Sve vreme trajanja ispitivanja trebalo bi da budu zadovoljeni kriterijumi kvaliteta i koncentracije supstance održane u okviru propisanih vrednosti, za šta se prilažu dokazi.

Za supstance koje su slabo rastvorljive u ispitivanom mediju ili imaju sposobnost obrazovanja stabilnih emulzija, ili disperzija, ili nisu stabilne u vodenim rastvorima, za početnu koncentraciju obavezno se uzima vrednost koncentracije koja je izmerena u rastvoru (ili ako ne postoji tehnička mogućnost, koncentracija izmerena u vodenom stubu) na početku ispitivanja. Koncentracija supstance se određuje nakon perioda stabilizacije i to pre uvođenja riba u sistem za ispitivanje.

U toku samog ispitivanja sprovode se dodatna merenja kako bi se potvrdile stvarne koncentracije izlaganja, kao i ispunjavanje kriterijuma kvaliteta.

Vrednost pH ne varira za više od 1.

*1.6. OPIS METODE*

U ispitivanju se koriste tri različita sistema:

1) statičan:

- u toku ispitivanja nema protoka ispitivanog rastvora (rastvori se ne obnavljaju u komorama za ispitivanje);

1) polustatičan:

- ispitivani rastvor ne protiče, ali se u komorama za ispitivanje rastvori redovno obnavljaju u dužim vremenskim intervalima (npr. na svaka 24 sata).

2) protočni:

- ispitivani rastvor se stalno obnavlja, čime se obezbeđuje stalna koncentracija rastvora i sprečava nagomilavanje kontaminenata u komorama za ispitivanje.

**1.6.1. Reagensi**

*1.6.1.1. Rastvori ispitivane supstance*

Za pripremu osnovnih rastvora u koncentracijama predviđenim za ispitivanje upotrebljava se dejonizovana voda ili obična voda u skladu sa specifikacijom iz odeljka 1.6.1.2. ove metode.

Koncentracije koje su određene za ispitivanje pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Ako se ispituju visoke koncentracije, supstanca se može odmah rastvoriti u vodi koja se koristi za razblaživanje.

Supstance se ispituju dok se ne dostigne granica rastvorljivosti. Za neke supstance, npr. one supstance koje imaju nisku rastvorljivost u vodi ili visoku vrednost koeficijenta raspodele u sistemu *n*-oktanol/voda (u daljem tekstu: Pow) ili one supstance koje pre obrazuju stabilne disperzije nego prave vodene rastvore, prihvatljivo je da se izvrši ispitivanje koncentracije supstance koja je iznad granice rastvorljivosti, kako bi potvrdili da je postignuta koncentracija maksimalne rastvorljivosti, odnosno stabilna koncentracija. Treba imati u vidu da ova koncentracija na neki drugi način ne ometa sistem za ispitivanje (npr. obrazovanjem površinskog sloja koji sprečava oksigenaciju vode, itd.).

Ultrazvučna disperzija, organski rastvarači, emulgatori ili disperziona sredstva mogu se upotrebiti za pripremu osnovnog rastvora supstance čija je rastvorljivost u vodi niska ili da bi se pospešila disperzija u ispitivanom medijumu. U slučaju da se koriste, sve ispitivane koncentracije sadrže istu količinu pomoćnih supstanci. Istoj koncentraciji pomoćnih supstanci, koja se koristi u serijama ispitivanja, izlažu se i ribe u dodatnoj kontrolnoj grupi. Koncentraciju pomoćnih supstanci u ispitivanom medijumu svesti na minimum i ona ni u kom slučaju ne sme premašiti vrednost od 100 mg/l.

Ispitivanje se izvodi bez podešavanja pH vrednosti. Ako se utvrdi da je došlo do značajne promene pH vrednosti, prilažu se rezultati dobijeni u ponovljenom ispitivanju za koje je pH vrednost prethodno bila podešena. pH vrednost osnovnog rastvora se podešava prema pH vrednosti vode za razblaživanje, osim ako ne postoji konkretan razlog da se tako ne uradi. U tu svrhu prvenstveno se koriste HCl i NaOH. Podešavanje pH vrednosti se vrši na način kojim se neće u značajnijoj meri promeniti koncentracija ispitivane supstance. U izveštaju o ispitivanju navesti ukoliko usled podešavanja pH vrednosti dođe do bilo kakve hemijske reakcije ili precipitacije ispitivane supstance.

*1.6.1.2. Voda za gajenje i razblaživanje*

Za ovu namenu koristi se pitka voda (iz izvora koji nije zagađen potencijalno štetnim koncentracijama hlora, teških metala ili drugih supstanci), kvalitetna prirodna voda ili rekonstituisana voda (videti Deo drugi ove metode). Ukupna tvrdoća vode da bude između 10 mg/l CaCO3 i 250 mg/l CaCO3, a pH vrednost između 6,0 i 8,5.

**1.6.2. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- automatski sistem za razblaživanje (u ispitivanju sa protočnim sistemom);

- oksimetar;

- instrument za određivanje tvrdoće vode;

- odgovarajuću aparaturu za kontrolu temperature;

- pH metar.

Sva oprema je izrađena od hemijski inertnog materijala.

**1.6.3. Ribe**

Ribe koje se koriste u ispitivanju su zdrave i bez vidljivih deformacija.

Vrsta ribe se bira na osnovu praktičnih kriterijuma: dostupnost vrste u toku čitave godine, jednostavnost održavanja, prikladnost za obavljanje ispitivanja, relativna osetljivost na hemikalije itd. Uzimaju se u obzir ekonomski, biološki i ekološki faktori koji mogu da utiču na konačan ishod ispitivanja. Kod izbora prikladne vrste riba uzeti u obzir i mogućnost poređenja rezultata i usklađenost između različitih laboratorija u svetu (videti u literaturi**1**).

Spisak vrsta riba koje se preporučuju za ispitivanje dat je u Delu trećem ove metode. Najčešće se koriste zebrica i kalifornijska pastrmka.

*1.6.3.1. Čuvanje*

Ribe su iz istog legla, a jedinke, ako je moguće, slične veličine i starosti. Riba se najmanje 12 dana drži pod sledećim uslovima:

3) uvođenje riba:

- shodno sistemu u kom se vrši ispitivanje (recirkulacijski ili protočni) i vrsti ribe;

4) voda:

- videti odeljak 1.6.1.2. ove metode;

5) svetlost:

- 12 do 16 sati osvetljenja dnevno;

6) koncentracije rastvorenog kiseonika:

- najmanje 80% zasićenja;

7) ishrana:

- tri puta nedeljno ili jednom dnevno, sa pauzom od 24 sata pre početka ispitivanja.

*1.6.3.2. Smrtnost*

Nakon perioda stabilizacije od 48 sati, beleži se smrtnost riba primenom sledećih kriterijuma:

1) ako je smrtnost u prvih 7 dana viša od 10% ukupne populacije, čitava populacija se odbacuje;

2) ako je smrtnost između 5% i 10% ukupne populacije, populacija se čuva dodatnih 7 dana. Ako ne dođe do dodatnih uginuća, populacija se prihvata, u suprotnom, ako se zabeleži još koje uginuće, populacija se odbacuje;

3) ako je smrtnost niža od 5% ukupne populacije, populacija se prihvata.

**1.6.4. Adaptacija**

Voda u kojoj se gaje ribe i voda koja se koristi u ispitivanju imaju isti kvalitet i temperaturni režim i to najmanje sedam dana pre početka ispitivanja.

**1.6.5. Postupak ispitivanja**

U preliminarnom ispitivanju određuje se tačan opseg koncentracija za ispitivanje.

Zajedno sa čitavom serijom ispitivanih koncentracija, koristi se i jedna kontrola u koju se ne dodaje ispitivana supstanca, a po potrebi i jedna kontrola sa pomoćnom supstancom.

U zavisnosti od hemijskih i fizičkih svojstava ispitivane supstance, bira se odgovarajući sistem za ispitivanje: statički, polustatički ili protočni, kako bi se zadržali kriterijumi kvaliteta.

Ribe se izlažu ispitivanoj supstanci na sledeći način:

1) izlaganje traje 96 sati;

2) najmanje po 7 jedinki riba za svaku ispitivanu koncentraciju;

3) komore za ispitivanje su odgovarajuće zapremine za zadati nasad;

4) nasad:

- maksimalni nasad je 1 g/l za statični i polustatični sistem, a za protočni sistem nasad može biti i veći;

5) ispitivane koncentracije:

- najmanje pet koncentracija koje se razlikuju za faktor ne veći od 2,2 i odabranih tako da pokrivaju čitav opseg smrtnosti od 0% do 100%;

6) voda:

- videti odeljak 1.6.1.2. ove metode;

7) svetlost:

- 12 do 16 sati osvetljenja dnevno;

8) temperatura:

- je odgovarajuća za vrstu (videti Deo treći ove metode), ali unutar ± 1° C za bilo koji sistem za ispitivanje;

9) koncentracije rastvorenog kiseonika:

- ne manja od 60% zasićenja pri odabranoj temperaturi;

10) ishrana:

- hrana se ne daje.

Ribe se proveravaju nakon prva 2 do 4 sata, a kasnije u intervalima od 24 sata. Ribe se smatraju mrtvim, ako dodirivanjem uske površine ispred leđnog peraja ne dođe do bilo kakve reakcije i ako se ne vide pokreti disanja. Mrtve ribe se uklanjaju odmah po opažanju, a smrtnost se stalno beleži. Beleže se i vidljive abnormalnosti (npr. gubitak ravnoteže, promene u načinu plivanja, poremećaj respiratornih funkcija, pigmentacije i sl).

Svakodnevno se mere pH vrednost, koncentracija rastvorenog kiseonika i temperatura.

Granično ispitivanje

Uz pomoć postupaka opisanih u ovoj metodi može se izvesti granično ispitivanje sa koncentracijom od 100 mg/l, kako bi se pokazalo da je LC50 veća od ove koncentracije.

Ako je priroda supstance takva da se ne može postići koncentracija od 100 mg/l, granično ispitivanje se izvodi sa koncentracijom koja je jednaka rastvorljivosti supstance (ili sa maksimalnom koncentracijom koja formira stabilnu disperziju) u medijumu (videti odeljak 1.6.1.1. ove metode).

Granično ispitivanje se izvodi sa 7 do 10 riba i sa istim brojem riba u kontroli. (Na osnovu binomne teoreme predviđa se da je u grupi od 10 riba sa nultom stopom smrtnosti, sa 99,9% intervalom poverenja, vrednost LC50 viša od koncentracije koja se koristila u graničnom ispitivanju. Ako u grupi od 7, 8 ili 9 riba nema smrtnosti, tada je najmanje sa 99% intervalom poverenja, LC50 viša od koncentracije koja se koristila).

Ako dođe do uginuća, izvodi se potpuno ispitivanje. Beleže se i subletalni efekti.

**2. PODACI I PROCENA**

Za svaki vremenski interval u kom se beleže opažanja (nakon 24, 48, 72 i 96 sati), na logaritamskom papiru grafički se predstavlja procenat smrtnosti u funkciji koncentracije, za svako preporučeno vreme izlaganja.

Primenom standardnih postupaka, kada je to moguće, za svaki vremenski interval opažanja određuje se vrednost LC50 i interval poverenja (*p* = 0,05). Ove vrednosti se zaokružuju na jednu ili najviše dve decimale.

U slučajevima kada je nagib krive koncentracija/procenat prevelik da bi omogućio tačno izračunavanje vrednosti LC50, dovoljno je grafički proceniti vrednosti.

Kada dve uzastopne koncentracije, u opsegu faktora 2,2 daju samo 0% ili 100% smrtnost, ove dve vrednosti dovoljne su za određivanje opsega u kom će se naći vrednosti LC50.

Ako se ustanovi da se stabilnost ili homogenost ispitivane supstance ne može održavati, ovo se opažanje beleži sa posebnim osvrtom na tu činjenicu kod tumačenja rezultata.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj, ako je moguće, sadrži sledeće podatke:

- vrsta ribe koja se ispituje (latinski naziv vrste, soj, dobavljač, prethodni tretman, veličina i broj riba za svaku ispitivanu koncentraciju supstance);

- poreklo vode za razblaživanje i njena osnovna hemijska svojstva (pH, tvrdoća, temperatura);

- postupak pripreme osnovnog rastvora i ispitivanih koncentracija (u slučaju supstanci koje imaju nisku rastvorljivost u vodi);

- koncentracija svake pomoćne supstance;

- spisak svih ispitivanih koncentracija i sve dostupne informacije o stabilnosti ispitivane supstance u rastvoru;

- opis korišćenih metoda i dobijenih rezultata (u slučaju hemijske analize);

- rezultati graničnog ispitivanja (u slučaju da je izvedeno);

- razlozi izbora i detalji o korišćenom sistemu za ispitivanje (npr. statični, polustatični, protočni, da li se vrši aeracija, način uvođenja riba, itd);

- opis opreme korišćene u ispitivanju;

- režim osvetljenja;

- koncentracije rastvorenog kiseonika, pH vrednost i temperatura ispitivanih rastvora na svakih 24 sata;

- dokazi da su ispunjeni kriterijumi kvaliteta;

- tablica koja pokazuje ukupnu smrtnost pri svakoj koncentraciji ispitivane supstance i kontrole (zajedno sa kontrolom pomoćne supstance, ako je potrebno) na kraju svakog vremenskog intervala;

- kriva dozne zavisnosti procenta smrtnosti od ispitivane koncentracije na kraju ispitivanja;

- ako je moguće, vrednosti LC50 na kraju svakog vremenskog intervala (sa 95% intervalom poverenja);

- statističke metode korišćene za određivanje LC50 vrednosti;

- (u slučaju da je korišćena referentna supstanca) uporedni rezultati ispitivanja;

- najviša ispitivana koncentracija koja nije dovela do uginuća ribe za vreme trajanja ispitivanja;

- najniža ispitivana test koncentracija koja je dovela do 100% smrtnosti za vreme trajanje ispitivanja.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2. AFNOR - Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio*- Static and Flow Through methods - NFT 90-303 June 1985.

3. AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to Salmo gairdneri - Static and Flow Through methods - NFT 90-305 June 1985.

4. ISO 7346/1,/2 and/3 - Water Quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan-Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5. Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden -Part II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

11. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12. Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWAWPCF, 1975.

13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T.and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96,99.

16. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

18. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19. Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634,1977, 65-84.

20. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

**Deo drugi**

**REKONSTITUISANA VODA**

Primer prikladnog izvora vode za razblaživanje

Sve hemikalije su analitičke čistoće.

Voda je kvalitetna destilovana voda ili dejonizovana voda sa električnom provodljivošću manjom od 5 mS/cm.

Oprema za destilaciju vode ne sme da sadrži bakarne delove.

Osnovni rastvori

Rastvoriti 11,76 g CaCl2·2H2O (kalcijum-hlorid dihidrat) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L.

Rastvoriti 4,93 g MgSO4·7H2O (magnezijum-sulfat heptahidrat) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L.

Rastvoriti 2,59 g NaHCO3 (natrijum-hidrogenkarbonat) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L.

Rastvoriti 0,23 g KCl (kalijum-hlorid) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L.

Rekonstituisana voda za razblaživanje

Pomešati po 25 ml svakog osnovnog rastvora i dopuniti vodom do zapremine od 1 L. Aerisati sve dok se koncentracija rastvorenog kiseonika ne izjednači sa koncentracijom kiseonika u zasićenom vazduhu.

Vrednost pH podesiti na 7,8 ± 0,2.

Ako je potrebno, pH se podešava dodavanjem NaOH (natrijum hidroksida) ili HCl (hlorovodonične kiseline).

Ovako pripremljena voda za razblaživanje ostavi se da stoji oko 12 sati i dalje se ne aeriše.

Zbir Ca i Mg jona u ovom rastvoru iznosi 2,5 mol/l. Odnos Ca i Mg jona iznosi 4:1, a Na i K jona iznosi 10:1. Ukupan alkalitet rastvora iznosi 0,8 mmol/l.

Izmene u postupku pripreme vode za razblaživanje ne smeju da utiču na sastav ili svojstva vode.

**Deo treći**

**VRSTE RIBA KOJE SE PREPORUČUJU ZA ISPITIVANJE**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Preporučena vrsta | Preporučeni temperaturni opseg (°C) | Preporučena  ukupna dužina test jedinke (cm) |
| *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton - Buchanan), zebrica | 20 do 24 | 3,0 ± 0,5 |
| *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) | 20 do 24 | 5,0 ± 2,5 |
| *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), šaran | 20 do 24 | 6,0 ± 2,0 |
| *Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) | 20 do 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), gupi | 20 do 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) | 20 do 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Onchorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae)(Walbaum 1988), kalifornijska pastrmka | 12 do 17 | 6,0 ± 2,0 |
| *Leuciscus idus* (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jaz | 20 do 24 | 6,0 ± 2,0 |

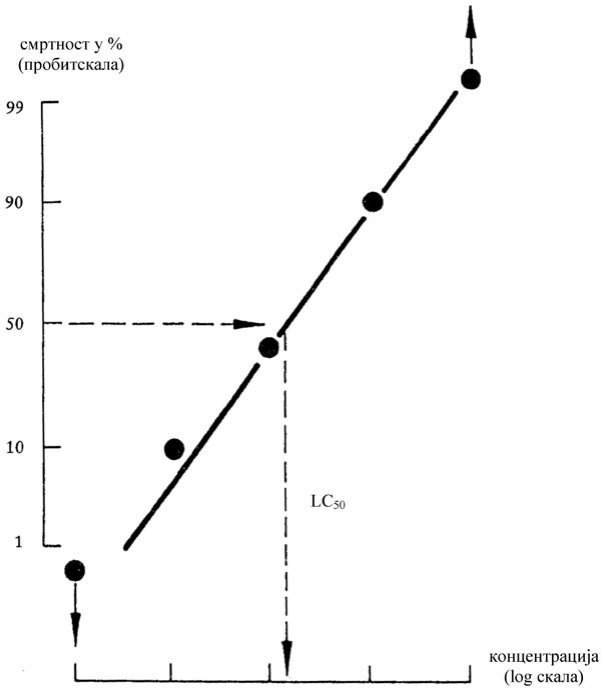
NABAVLJANJE RIBA

Navedene vrste riba lako se razmnožavaju i uzgajaju. U mnogim delovima sveta ove vrste riba mogu se nabaviti u toku cele godine. Kako su navedene vrste pogodne i za uzgajanje u laboratorijskim uslovima, zdravstveno stanje i poreklo jedinki koje se koriste za ispitivanje je, uz kontrolu prisustva parazita i bolesti, uvek poznato.

**Deo četvrti**

**PRIMER ZAVISNOSTI KONCENTRACIJE OD PROCENTA SMRTNOSTI**

Primer određivanja LC50 uz pomoć logaritamskog papira



**C.2. METODA ISPITIVANJA AKUTNE TOKSIČNOSTI: IMOBILIZACIJA *Daphnia sp.***

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 202 (2004).

*1.1. UVOD*

Metoda opisuje ispitivanje akutne toksičnosti koje služi za procenu efekta supstanci na dafnije. Postojeće metode ispitivanja korišćene su u najvećoj mogućoj meri**1, 2, 3**.

*1.2. DEFINICIJE*

Pojedini izrazi upotrebljeni u ovoj metodi ispitivanja imaju sledeće značenje:

Efektivna koncentracija (EC50) jeste koncentracija supstance za koju je procenjeno da dovodi do imobilizacije 50% jedinki populacije koje su izložene dejstvu supstance u toku unapred definisanog perioda. Dozvoljeno je korišćenje druge definicije uz objašnjenje i navođenje literature.

Imobilisane životinje jesu životinje koje ne zaplivaju 15 sekundi nakon što je rastvor u posudi za ispitivanje lagano uzburkan (čak i u slučaju da i dalje pokreću antene).

*1.3. PRINCIP METODE*

Mlade dafnije (neonate), starosti do 24 sata na početku ispitivanja, neprekidno se izlažu ispitivanoj supstanci u seriji koncentracija u toku 48 sati. Broj imobilisanih jedinki beleži sena svaka 24 i 48 sati, a vrednosti se porede sa vrednostima u kontrolnoj grupi. Analizom rezultata izračunava se EC50 nakon 48 sata (videti definicije iz odeljka 1.2. ove metode). Izračunavanje EC50 nakon 24 sata nije obavezno.

*1.4. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Potrebno je imati podatke o rastvorljivosti u vodi i naponu pare ispitivane supstance. Treba da bude dostupna i pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju supstance u ispitivanom rastvoru sa podacima o efikasnosti i granicama detekcije. Od koristi su i podaci o strukturnoj formuli, čistoći supstance, stabilnosti u vodi i na svetlu, koeficijent raspodele u sistemun-oktanol/voda (Pow) i rezultati ispitivanja biorazgradljivosti (videti metodu C.4. koja je data u ovom prilogu).

Napomena: Smernice za izvođenje ispitivanja na supstancama sa fizičkim i hemijskim svojstvima koja ih čine teškim za ispitivanje mogu se naći u uputstvu**4**.

*1.5. REFERENTNE SUPSTANCE*

Efektivna koncentracija (EC50) referentne supstance određuje se da bi se potvrdila pouzdanost uslova ispitivanja. Za ovu namenu preporučuje se upotreba toksičnih supstanci**I** koje su korišćene u međulaboratorijskim ispitivanjima**1,5**. Ispitivanja sa referentnom supstancom izvode se jednom mesečno, a najmanje dva puta godišnje.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**I** Na osnovu rezultata međulaboratorijskih ispitivanja i Tehničke ispravke ISO 6341 standarda, opseg EC50 za kalijum-dihromat (K2Cr2O7) iznosi 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

*1.6. KRITERIJUMI KVALITETA*

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, ispunjavaju se sledeći kriterijumi kvaliteta:

U posudama za ispitivanje u kojima su kontrolne grupe (uključujući i grupe koje sadrže rastvarač), procenat imobilisanih dafnija na kraju ispitivanja ne sme biti veći od 10%.

U posudama za ispitivanje, uključujući i posude u kojima su kontrolne grupe, koncentracija rastvorenog kiseonika na kraju ispitivanja je ≥ 3 mg/l.

Napomena: Da bi se zadovoljio prvi kriterijum, u kontrolnim grupama procenat imobilisanih dafnija ne sme biti veći od 10%. Pored toga, ne sme biti više od 10% jedinki koje pokazuju bilo kakve znake bolesti ili stresa, poput gubljenja boje, ili neko drugo nesvojstveno ponašanje.

*1.7. OPIS METODE*

**1.7.1. Oprema**

Posude za ispitivanje i ostala oprema koja dolazi u dodir sa ispitivanim rastvorom su od stakla ili nekog drugog hemijski inertnog materijala. Najčešće se kao posude za ispitivanje koriste epruvete ili čaše. Pre svake upotrebe posude se peru standardnim postupkom za pranje laboratorijskog posuđa. Isparavanje vode i upadanje prašine u rastvor tokom ispitivanja, preduprediti poklapanjem posuda, ali tako da poklopac ne prijanja u potpunosti. Lako isparljive supstance ispituju se u dobro zatvorenim posudama, koje su napunjene do vrha ispitivanim rastvorom, dovoljno velike zapremine da se izbegne da kiseonik nedostaje ili pad koncentracije rastvorenog kiseonika ispod kriterijuma kvaliteta (videti odeljak 1.6. i prvi pasus odeljka 1.8.3. ove metode).

Neophodna je i sledeća oprema (sva ili samo pojedini aparati):

- oksimetar (sa mikrokiseoničnom elektrodom ili neka druga oprema pogodna za merenje koncentracije kiseonika u maloj zapremini uzorka);

- pH metar;

- pogodna oprema za kontrolu temperature;

- oprema za određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljenika (u daljem tekstu: TOC);

- oprema za određivanje hemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: HPK);

- oprema za određivanje tvrdoće vode, itd.

**1.7.2. Ispitivani organizam**

Za ispitivanje se koristi vrsta *Daphnia magnaStraus*, a pogodne su i ostale vrste roda *Daphnia* (npr. *Daphnia pulex*). Na početku ispitivanja, jedinke (neonate) moraju biti mlađe od 24 sata, a da bi se smanjila varijabilnost, izričito se preporučuje da se ne uzimaju iz prvog legla adulta. Poreklo jedinki je iz zdravog legla (u kom jedinke ne pokazuju bilo kakve znake stresa poput visoke smrtnosti, prisustva mužjaka, pojave omotača (ephippia), kašnjenja u dobijanju legla, obezbojene jedinke, itd.). Sve jedinke koje se koriste u konkretnom ispitivanju da potiču iz legla koje je ustanovljeno iz jednog matičnog legla. Matična legla se gaje u uslovima koji su u pogledu svetlosnog i temperaturnog režima i medijuma slični onim u toku ispitivanja. U slučaju da je medijum za gajenje dafnija drugačiji od onog koji se koristi u ispitivanju, uvodi se aklimatizacioni period. Adultne jedinke, od kojih će se dobiti neonate koje se koriste u ispitivanju, prebacuju se u medijum za razblaživanje najmanje 48 sati pre početka ispitivanja i drže, do samog početka ispitivanja, na temperaturi na kojoj će se izvoditi ispitivanje.

**1.7.3. Voda za gajenje i razblaživanje**

Prirodna voda (površinska ili podzemna), rekonstituisana voda ili dehlorisana vodovodna voda predstavljaju pogodnu vodu za gajenje dafnija i vodu za razblaživanje ispitivanog rastvora, pod uslovom da dafnije u njima preživljavaju u toku uzgoja, aklimatizacionog perioda i u toku ispitivanja, ne pokazujući znake stresa. Bilo koja voda koja zadovoljava svojstva prihvatljive vode za razblaživanje (videti Deo drugi ove metode) pogodna je za ispitivanje. Kvalitet vode je ujednačen u toku celog ispitivanja. Rekonstituisana voda se priprema tako što se u dejonizovanu ili destilovanu vodu dodaje tačna količina potrebnih sastojaka poznate analitičke čistoće. Primeri rekonstituisane vode mogu se naći u literaturi**1,6** i u Delu trećem ove metode. Važno je napomenuti da medijume koji sadrže helatizirajuće supstance, poput medijuma M4 i M7 (videti Deo treći ove metode), ne koristiti kada se ispituju supstance koje sadrže metale. Vrednost pH da bude u opsegu od 6 do 9. Za ispitivanje sa vrstom *Daphnia magna* preporučuje se tvrdoća vode od 140 mg/lCaCO3 do 250 mg/lCaCO3, dok je za druge vrste roda *Daphnia* pogodnija niža tvrdoća vode. Voda za razblaživanje se aeriše pre korišćenja u ispitivanju, da bi koncentracija rastvorenog kiseonika dostigla zasićenje.

Ako se koristi prirodna voda, parametre kvaliteta meriti najmanje dva puta godišnje ili kad god se posumnja da je došlo do značajnih promena karakteristika (videti prethodni pasus i Deo drugi ove metode). Treba izmeriti i sadržaj teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ako se koristi dehlorisana vodovodna voda, poželjno je svakodnevno meriti sadržaj hlora. Ako se koristi površinska ili podzemna voda, izmeriti elektroprovodljivost i TOC ili HPK.

**1.7.4. Ispitivani rastvori**

Ispitivani rastvori izabranih koncentracija najčešće se prave razblaživanjem osnovnog rastvora. Zbog toga se osnovni rastvor dobija direktnim rastvaranjem ispitivane supstance u vodi za razblaživanje. Treba, u najvećoj mogućoj meri, izbegavati upotrebu rastvarača, emulzifikatora i disperezionih sredstava. U nekim slučajevima ove pomoćne supstance su neophodne kako bi se uspešno napravio koncentrovani osnovni rastvor. Upotreba rastvarača, emulzifikatora i disperzionih sredstava opisana je u literaturi**4**. Koncentracija ispitivane supstance u rastvoru ne sme da pređe granicu rastvorljivosti supstance u vodi za razblaživanje.

Ispitivanje izvesti bez podešavanja pH vrednosti. Ako dođe da značajnije promene pH vrednosti, preporučuje se ponavljanje ispitivanja uz podešavanje pH vrednosti na vrednost koju je voda za razblaživanje imala pre rastvaranja ispitivane supstance. Podešavanje pH vrednosti izvodi se tako da se koncentracija ispitivane supstance u osnovnom rastvoru značajnije ne promeni, kao i da se izbegne bilo kakva hemijska reakcija ili precipitacija ispitivane supstance. Za podešavanje pH vrednosti uglavnom se koriste rastvori HCl i NaOH.

*1.8. POSTUPAK*

**1.8.1. Uslovi**

*1.8.1.1. Ispitivane i kontrolne grupe*

Posude za ispitivanje pune se odgovarajućim zapreminama vode za razblaživanje i ispitivanim rastvorima. Zapreminski odnos vazduh/voda da bude jednak u svim ispitivanim i kontrolnim grupama. Nakon toga se dafnije unose u posude za ispitivanje. U ispitivanju se za svaku koncentraciju, kao i kontrolnu grupu, koristi najmanje po 20 jedinki, podeljenih u 4 grupe (ponavljanja) od po 5 jedinki. Zapremina rastvora je dovoljna da obezbedi minimum 2 ml rastvora po jedinki, odnosno, minimalna zapremina po posudi za ispitivanje je 10 ml. Ispitivanje se odvija u polustatičnim (uz kompletno periodično obnavljanje ispitivanog rastvora) ili u protočnim sistemima, ako koncentracije ispitivane supstanca nisu stabilne.

U svakom ispitivanju, obavezno je postaviti po jednu kontrolnu grupu (4 posude sa po 5 jedinki) isključivo sa vodom korišćenom za razblaživanje. Ukoliko je korišćena i pomoćna supstanca pri pravljenju rastvora, postavlja se i dodatna kontrolna grupa sa pomoćnom supstancom rastvorenom u vodi za razblaživanje.

*1.8.1.2. Određivanje koncentracije*

Kada nisu dostupni podaci o toksičnosti ispitivane supstance, a u cilju određivanja opsega ispitivanih koncentracija, izvodi se preliminarno ispitivanje. Preliminarno ispitivanje se izvodi u širokom opsegu koncentracija ispitivane supstance, pa je dovoljno postaviti po 5 jedinki po kontrolnoj i ispitivanoj grupi (bez ponavljanja). Dužina preliminarnog ispitivanja može biti 48 sati, ali ako se potrebni podaci dobiju u kraćem roku, ispitivanje se može prekinuti nakon 24 sata.

Preliminarno ispitivanje se postavlja u 5 ispitivanih koncentracija, u geometrijskoj seriji sa faktorom od minimum 2,2. Obrazloženje je neophodno ako se koristi manje od 5 različitih ispitivanih koncentracija. U preliminarnom ogledu, izlaganje dafnija najvišoj primenjenoj koncentracija potrebno je da dovede do 100% imobilizacije, dok izlaganje najnižoj izabranoj koncentraciji ne treba da dovede do značajnijeg odgovora.

*1.8.1.3. Uslovi u toku ispitivanja*

Temperatura na kojoj se izvode ispitivanja za procenu akutne toksičnosti da bude u opsegu od 18° C do 22° C, a u toku jednog ispitivanja akutne toksičnosti, izabrana temperatura ne varira više od ± 1° C. Preporučuje se svetlosni režim od 16 sati svetla i 8 sati mraka, ali je kod fotonestabilnih supstanci dozvoljeno da se celo ispitivanje izvede u mraku.

U toku ispitivanja, nije dozvoljena aeracija rastvora u posudama. Ispitivanje izvesti bez podešavanja pH vrednosti. Životinje se ne hrane u toku trajanja ispitivanja.

*1.8.1.4. Dužina ispitivanja*

Ispitivanje traje 48 sati.

**1.8.2. Posmatrani odgovor**

Svaka posuda se proverava nakon 24 i 48 sati od početka ispitivanja (videti definicije iz odeljka 1.2. ove metode). Pored imobilizacije jedinki, prati se i beleži svako neuobičajeno ponašanje ili pojava.

**1.8.3. Merenja**

Koncentracija rastvorenog kiseonika i pH vrednost mere se na početku i na kraju ispitivanja u kontrolnoj i u ispitivanoj grupi u kojoj je primenjena najviša koncentracija ispitivane supstance. Koncentracija rastvorenog kiseonika u kontrolnim grupama ispunjava kriterijume kvaliteta (videti odeljak 1.6. ove metode). Ni u jednom ispitivanju pH vrednost ne varira za više od 1,5. Temperatura se obično prati u posudama iz kontrolnih grupa ili u prostoriji u kojoj je postavljen ogled. Preporuka je da se temperatura neprekidno prati, a najmanje na početku i na kraju ispitivanja.

Koncentracije supstance izmeriti u grupama sa najnižom i najvišom koncentracijom, na početku i na kraju ispitivanja**4**. Preporučuje se da se rezultati tumače na osnovu izmerenih koncentracija. Ako se dokaže da se koncentracija ispitivane supstance ne menja u odnosu na nominalnu ili početno izmerenu za više od ± 20%, rezultati se mogu iskazati na osnovu nominalnih ili početno izmerenih vrednosti.

*1.9. GRANIČNA STUDIJA*

Uz pomoć postupaka opisanih u ovoj metodi, može se izvesti granična studija sa koncentracijom ispitivane supstance od 100 mg/l ili sa vrednošću koncentracije rastvorljivosti supstance u medijumu (uvek se bira niža od ove dve vrednosti) kako bi se pokazalo da je LC50 viša od ove koncentracije. Granična studija se izvodi sa 20 jedinki dafnije, podeljenih u 4 grupe od po 5 jedinki po posudi i sa istim brojem i rasporedom jedinki u kontrolnoj grupi. Ako dođe do imobilizacije jedinki u ispitivanoj grupi, obavezno se izvodi potpuno ispitivanje. Beleži se svako neuobičajeno ponašanje jedinki.

**2. PODACI**

Svi podaci dobijeni ispitivanjem akutne toksičnosti navode se tabelarno. Za svaku ispitivanu i kontrolnu grupu navodi se broj jedinki na početku ispitivanja i broj imobilisanih jedinki za svaki posmatrani interval.

Procenat imobilisanih jedinki nakon 24 i 48 sati grafički se prikazuje u funkciji ispitivanih koncentracija. Podaci se analiziraju primerenom statističkom metodom (npr. probit analiza), izračunava se nagib krive i EC50 sa 95% intervalima poverenja (p = 0,05).

Ukoliko za dobijene rezultate standardne metode za izračunavanje EC50 nisu primenljive, za aproksimaciju EC50 uzima se geometrijska sredina između dve ispitivane koncentracije - najviše ispitivane koncentracije koja nije dovela do imobilizacije i najniže ispitivane koncentracije koja je dovela do imobilizacije 100% jedinki u ispitivanoj grupi.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- fizička i najvažnija fizička i hemijska svojstva;

- podaci o hemijskim svojstvima, uključujući čistoću supstance;

2) ispitivanoj vrsti:

- podaci o poreklu i vrsti dafnija, dobavljač (ako je poznat), uslovi laboratorijskog gajenja kulture (uključujući poreklo, količine i vrstu hrane, dinamiku ishrane);

3) uslovima u toku ispitivanja:

- opis posuda: tip posude, zapremina rastvora, broj jedinki po posudi, broj posuda po ispitivanoj koncentraciji (grupi);

- način pripreme osnovnog i ispitivanog rastvor, uključujući i podatke o upotrebi pomoćne supstance (vrsta i koncentracije);

- opis vode korišćene za razblaživanje; poreklo i osnovne svojstva (pH, tvrdoća, odnos Ca/Mg, odnos Na/K, alkalitet, elektroprovodljivost), sastav rekonstituisane vode (ako je korišćena);

- uslovi inkubacije: temperatura, intenzitet svetla i svetlosni režim, koncentracija kiseonika, pH vrednost, itd;

4) rezultatima:

- broj i procenat imobilisanih jedinki ili jedinki koje su pokazale znake stresa (uključujući atipično ponašanje) u kontrolnim i svim ispitivanim grupama, u trenutku posmatranja, kao i opis uočenog odgovora;

- rezultate i datum ispitivanja sa referentom supstancom, ako su dostupni;

- nominalne koncentracije ispitivane supstance i rezultate svih merenja koncentracije ispitivane supstance u posudama, efikasnost analitičke metode korišćene za merenja i granice detekcije;

- rezultate svih merenja osnovnih fizičko-hemijskih parametara u toku ispitivanja (pH, koncentracija rastvorenog kiseonika);

- vrednost EC50 nakon 48 sati za imobilizaciju kao posmatrani parametar sa intervalom poverenja i grafički prikaz regresionog modela korišćenog za izračunavanje EC50 vrednosti; nagib krive dozne zavisnosti i standardna greška, statističke metode korišćene za izračunavanje EC50 vrednosti (ovi podaci se prilažu i ukoliko su izračunati za rezultate dobijene nakon perioda od 24 sata);

- objašnjenje za svako odstupanje od metode i da li je odstupanje uticalo na rezultate ispitivanja.

**4. LITERATURA**

1. ISO 6341. (1996). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines - Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia spp.* EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 - American Society for Testing and Materials. p. 65-84

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

**Deo drugi**

**HEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZBLAŽIVANJE**

|  |  |
| --- | --- |
| Supstanca | Koncentracija |
| Suspendovane materije | < 20 mg/l |
| Ukupni organski ugljenik | < 2 mg/l |
| Nejonizovan amonijak | < 1 μg/l |
| Rezidualni hlor | < 10 μg/l |
| Ukupni organofosforni pesticidi | < 50 ng/l |
| Ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili | < 50 ng/l |
| Ukupni organski hlor | < 25 ng/l |

**Deo treći**

**PRIMERI REKONSTITUISANE VODE ISO VODA ZA ISPITIVANJE1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Osnovni rastvori (pojedinačne supstance) | | Zapremine osnovnih rastvora koje dodati i dopuniti do 1 L vode**II** radi pripreme rekonstituisane vode |
| Supstanca | Konc. supstance u vodi**II** |
| Kalcijum-hlorid CaCl2·2H2O | 11,76 g/l | 25 ml |
| Magnezijum-sulfat MgSO4·7H2O | 4,93 g/l | 25 ml |
| Natrijum-bikarbonat NaHCO3 | 2,59 g/l | 25 ml |
| Kalcijum-hlorid KCl | 0,23 g/l | 25 ml |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**II** Voda prihvatljive čistoće, npr. dejonizovana, destilovana ili voda dobijena reverznom osmozom, sa električnom provodljivošću ispod 10 μS/cm

ELANDT M4 I M7 MEDIJUM

**Adaptacija na Elandt M4 i M7 medijum**

Laboratorije su imale poteškoće kod direktnog prebacivanja dafnija u Elandt M4 i M7 medijum. Bolji uspeh se postiže postepenom aklimatizacijom, na primer premeštanje dafnija iz sopstvenog u 30% Elandt, pa u 60% Elandt pa tek onda u 100% Elandt. Može biti potrebno i do mesec dana aklimatizacionog perioda.

**Priprema**

Mikronutrijenti

Posebni osnovni rastvori (I) pojedinih mikronutrijenata pripremaju se korišćenjem vode prihvatljive čistoće, npr. dejonizovane, destilovane ili vode dobijene reverznom osmozom. Od ovako pripremljenih osnovnih rastvora, pravi se sledeći osnovni rastvor (II), koji sadrži sve potrebne mikroelemente.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Osnovni rastvor (I): mikronutrijenti (pojedinačne supstance) | Količina koja se dodaje u vodu (mg/l) | Koncentracija (u odnosu na M4) | Za pripremu kombinovanog osnovnog rastvora (II), dodati sledeće zapremine osnovnih rastvora (I) i dopuniti do 1L vode\* | |
| M4 | M7 |
| H3BO3 | 57.190 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| MnCl2·4H2O | 7.210 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| LiCl | 6.120 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| RbCl | 1.420 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| SrCl2·6H2O | 3.040 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| Na2MoO2·2H2O | 1.260 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| CuCl2 | 335 | 20.000 puta | 1 | 0,25 |
| ZnCl2 | 260 | 20.000 puta | 1 | 1 |
| CoCl2x6H2O | 200 | 20.000 puta | 1 | 1 |
| KJ | 65 | 20.000 puta | 1 | 1 |
| Na2SeO3 | 43,8 | 20.000 puta | 1 | 1 |
| NH4VO3 | 11,5 | 20.000 puta | 1 | 1 |
| Na2EDTA·2H2O | 5.000 | 2.000 puta | - | - |
| FeSO4·7H2O | 1.991 | 2.000 puta | - | - |

Na2EDTA i FeSO4 pripremaju se pojedinačno, pomešaju i odmah autoklaviraju, što čini:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 L rastvora Fe - EDTA |  | 1.000 puta | 20 | 5 |

Priprema Elandt M4 i M7 medijuma

M4 i M7 medijumi pripremaju se korišćenjem osnovnog rastvora (II), makronutrijenata i vitamina, na sledeći način:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Količina koja se dodaje u vodu (mg/l) | Koncentracija (u odnosu na M4) | Količina osnovnog rastvora (II) koja se dodaje pri pripremi medijuma (mg/l) | |
| M4 | M7 |
| Osnovni rastvor (II) (kombinovani mikronutrijenti) |  | 20 puta | 50 | 50 |
| Osnovni rastvori makronutrijenata (pojedinačne supstance) |  |  |  |  |
| CaCl2·2H2O | 293.800 | 1.000 puta | 1,0 | 1,0 |
| MgSO4·7H2O | 246.600 | 2.000 puta | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58.000 | 10.000 puta | 0,1 | 0,1 |
| NaHCO3 | 64.800 | 1.000 puta | 1,0 | 1,0 |
| Na2SiO3·9H2O | 50.000 | 5.000 puta | 0,2 | 0,2 |
| NaNO3 | 2.740 | 10.000 puta | 0,1 | 1,0 |
| KH2PO4 | 1.430 | 10.000 puta | 0,1 | 1,0 |
| K2HPO4 | 1.840 | 10.000 puta | 0,1 | 1,0 |
| Kombinovani vitaminski rastvor |  |  | 0,1 | 0,1 |

Kombinovani vitaminski rastvor priprema se tako što se 3 vitamina dodaju u vodu na sledeći način:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tiamin-hidrohlorid | 750 | 10.000 puta |  |  |
| Cianokobalamin (B12) | 10 | 10.000 puta |  |  |
| Biotin | 7,5 | 10.000 puta |  |  |

Kombinovani vitaminski rastvor se čuva u zamrzivaču, u malim porcijama. Vitaminski rastvor se dodaje u medijum neposredno pre upotrebe.

Napomena: Da se izbegne taloženje soli pri pripremi medijuma, pojedini rastvori se razblažuju u 500 ml do 800 ml dejonizovane vode i dopune do 1 L.

Napomena: Receptura za M4 je prvi put objavljena u "Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33".

**C.3. ISPITIVANJE INHIBICIJE RASTA SLATKOVODNIH ALGI I CIJANOBAKTERIJA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 201 (2006)**1**.

*1.1. UVOD*

Metode ispitivanja se periodično preispituju i ažuriraju u cilju naučnog napretka. Metodu ispitivanja C.3. bilo je potrebno revidirati kako bi se uključile dodatne vrste i ispunili zahtevi procene opasnosti i klasifikacije hemikalija. Revizija je obavljena na osnovu širokog praktičnog iskustva, naučnog napretka u oblasti toksikoloških istraživanja na algama i široke regulatorne primene koja je usledila nakon njenog donošenja.

*1.2. DEFINICIJE*

Pojedini izrazi upotrebljeni u ovoj metodi ispitivanja imaju sledeće značenje:

Biomasa jeste suva masa žive materije sadržane u populaciji izražena u odnosu na datu zapreminu; npr. mg algi/l rastvora za ispitivanje. Biomasa se obično definiše kao masa, ali se u ovom ispitivanju ova reč odnosi na masu po zapremini. U ovom ispitivanju se po pravilu mere i alternativni parametri za biomasu, kao što je broj ćelija, fluorescencija itd, pa se izraz biomasa odnosi i na te alternative mere.

Koeficijent varijacije jeste bezdimenzionalna mera varijabilnosti parametra, definisana kao odnos standardne devijacije i srednje vrednosti. Ova vrednost može biti izražena i u procentima. Srednji koeficijent varijacije prosečne specifične brzine rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura izračunava se na sledeći način:

1. Izračuna se koeficijent varijacije (u daljem tekstu: CV) prosečne specifične brzine rasta iz dnevnih/etapnih brzina rasta za odgovarajuće ponavljanje i izrazi u procentima.

2. Izračuna se srednja vrednost svih izračunatih vrednosti iz tačke 1. kako bi se dobio srednji koeficijent varijacije dnevne/etapne specifične brzine rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura.

ECx jeste koncentracija ispitivane supstance rastvorene u podlozi za ispitivanje koja rezultira x%-tnim (npr. 50%) smanjenjem rasta ispitivanog organizma u okviru navedenog perioda izlaganja (koje izričito navesti ako odstupa od punog ili uobičajenog trajanja ispitivanja). Da se nedvosmisleno pokaže da li je vrednost EC dobijena iz brzine rasta (growth rate) ili iz prirasta (yield) koriste se simboli ErC i EyC.

Hranljiva podloga jeste kompletna sintetička podloga kulture u kojoj ispitivane alge rastu kad se izlože ispitivanoj supstanci. Ispitivana supstanca se po pravilu rastvara u podlozi koja se koristi tokom ispitivanja.

Brzina rasta (prosečna specifična brzina rasta) jeste logaritamsko povećanje biomase u periodu izlaganja.

Najniža koncentracija sa zapaženim efektom (u daljem tekstu: LOEC) jeste najniža ispitivana koncentracija kod koje je tokom određenog perioda izlaganja zapažen statistički značajan negativni efekat supstance na rast (pri r < 0,05) u poređenju sa kontrolom. Sve ispitivane koncentracije iznad LOEC imaju jednak ili veći štetan efekat od onoga koji je zabeležen pri LOEC. Ako se ova dva uslova ne mogu ispuniti, detaljno se objašnjava kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).

Najviša koncentracija bez zapaženog efekta (u daljem tekstu: NOEC) jeste ispitivana koncentracija neposredno ispod LOEC.

Promenljiva odgovora jeste promenljiva za procenu toksičnosti izvedena iz bilo kojeg merenog parametra koji opisuje biomasu primenom različitih metoda izračunavanja. Kod ove metode brzina rasta i prirasta su promenljive odgovora dobijene direktnim merenjem biomase ili bilo kojeg navedenog zamenskog parametra.

Specifična brzina rasta jeste promenljiva odgovora definisana kao količnik razlike prirodnih logaritama posmatranog parametra (kod ove metode ispitivanja, biomasa) i odgovarajućeg vremenskog perioda.

Prirast jeste vrednost merne promenljive na kraju perioda izlaganja umanjena za vrednost merne promenljive na početku perioda izlaganja, kojom se izražava povećanje biomase tokom ispitivanja.

*1.3. PRIMENJIVOST ISPITIVANJA*

Ova metoda ispitivanja se najlakše primenjuje kod supstanci rastvorljivih u vodi za koje se može pretpostaviti da će u uslovima ispitivanja ostati u vodi. Kada se ispituju supstance koje su isparljive, jako adsorptivne, obojene, slabo rastvorljive u vodi i supstance koje mogu uticati na raspoloživost hranljivih materija ili minerala u podlozi za ispitivanje, možda će biti potrebno da se opisani postupak izmeni (npr. zatvoreni sistem, kondicioniranje sudova za ispitivanje). Smernice za neke izmene date su u literaturi**2,3,4**.

*1.4. PRINCIP ISPITIVANJA*

Svrha ispitivanja je da se odrede efekti supstanci na rast slatkovodnih mikroalgi i/ili cijanobakterija. Eksponencijalno rastući test organizmi izlažu se ispitivanoj supstanci u šaržnim kulturama, po pravilu tokom 72 sata. Iako ispitivanja relativno kratko traju mogu se oceniti efekti u nekoliko generacija.

Odgovor sistema sastoji se u smanjenju rasta niza kultura algi (ispitivane jedinice) koje su izložene različitim koncentracijama ispitivane supstance. Odgovor se ocenjuje kao funkcija koncentracije izlaganja u odnosu na prosečni rast ponovljenih, neizloženih kontrolnih kultura. Da bi se u punoj meri izrazio odgovor sistema na toksične efekte (optimalna osetljivost), kulturama se ostavlja dovoljno vremena da postignu neograničen eksponencijalni rast, uz dovoljno hranljivih materija i neprekidno osvetljenje kako bi se izmerilo smanjenje specifične brzine rasta.

Rast i inhibicija rasta kvantifikuju se merenjima biomase algi u zavisnosti od vremena. Biomasa algi definisana je kao suva masa po zapremini, npr. mg algi/l rastvora za ispitivanje. Suvu masu je teško meriti pa se koriste alternativni parametri. Od ovih alternativnih parametara najčešće se koristi broj ćelija. Ostali alternativni parametri su zapremina ćelija, fluorescencija, optička gustina, itd. Faktor konverzije između alternativnih parametara i biomase da bude poznat.

Praćeni parametari ispitivanja su inhibicija rasta, izražena kao logaritamsko povećanje biomase (prosečna specifična brzina rasta) u periodu izlaganja. Iz prosečnih specifičnih brzina rasta zabeleženih u seriji ispitivanih rastvora određuje se koncentracija koja izaziva određeno x%-tno smanjenje brzine rasta (npr. 50%), koja se izražava kao ErCx (npr. ErC50).

Da bi ova metoda ispitivanja mogla da se primeni, izračunavanje rezultata se zasniva na prosečnoj specifičnoj brzini rasta iz razloga navedenih u odeljku 2.2. ove metode. U ovoj metodi ispitivanja koristi se i dodatni promenljivi odgovor, prirast, koji je potreban da bi se ispunili određeni regulatorni zahtevi u nekim državama. Definiše se kao biomasa na kraju perioda izlaganja umanjena za biomasu na početku perioda izlaganja. Iz prirasta zabeleženog u seriji ispitivanih rastvora izračunava se koncentracija koja izaziva određeno x%-tno smanjenje prirasta (npr. 50%), koja se izražava kao EyCx (npr. EyC50).

Osim toga, može se statistički odrediti najniža koncentracija sa zapaženim efektom (LOEC) i najviša koncentracija bez zapaženog efekta (NOEC).

*1.5. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Informacije o ispitivanoj supstanci, koje mogu biti korisne za određivanje uslova ispitivanja obuhvataju strukturnu formulu, čistoću, stabilnost na svetlu, stabilnost u uslovima ispitivanja, svojstva apsorpcije svetla, rKa i rezultate istraživanja konverzije, uključujući biorazgradljivost u vodi.

Treba da budu poznati rastvorljivost u vodi, koeficijent raspodele oktanol/voda (Pow) i napon pare ispitivane supstance, i da bude na raspolaganju validirana metoda za kvantifikaciju supstance u rastvorima za ispitivanje sa dokumentovanim iskorišćenjem i granicom detekcije.

*1.6. REFERENTNA SUPSTANCA*

Jedna ili više referentnih supstanci kao npr. 3,5-dihlorfenol korišćen u međunarodnom međulaboratorijskom ispitivanju**4**, mogu se koristiti za proveru postupka ispitivanja. Kao referentna supstanca za zelene alge može se koristiti i kalijum dihromat. Poželjno je da se referentna supstanca ispituje najmanje dva puta godišnje.

*1.7. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo validno ispunjavaju se sledeći kriterijumi:

- Biomasa u kontrolnim kulturama eksponencijalno se povećava najmanje za faktor 16 u periodu ispitivanja od 72 sata. To odgovara specifičnoj brzini rasta od 0,92 dana-1. Kod vrsta koje se najčešće koriste, brzina rasta je obično znatno viša (videti Dodatak prvi ove metode). Ovaj kriterijum možda neće biti zadovoljen ako se koriste vrste koje rastu sporije od onih koje su navedene u Dodatku 1. ove metode. U tom slučaju period ispitivanja produžiti koliko je potrebno da se u kontrolnim kulturama dobije najmanje 16-struki rast, uz eskponencijalni rast tokom celokupnog perioda ispitivanja. Period ispitivanja može se skratiti na najmanje 48 sati da bi se održao neograničeni eksponencijalni rast tokom ispitivanja, pod uslovom da je postignut minimalni faktor povećanja 16.

- Srednji koeficijent varijacije etapnih specifičnih brzina rasta (dan 0-1, 1-2 i 2-3, za ispitivanje koje traje 72 sata) u kontrolnim kulturama (videti odeljak 1.2. koeficijent varijacije) ne sme biti viši od 35%. Za izračunavanje etapne specifične brzine rasta videti odeljak 2.2.1. ove metode. Ovaj kriterijum važi za srednju vrednost koeficijenata varijacije izračunatih za ponavljanja kontrolnih kultura.

- Kod ispitivanja sa vrstama *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Desmodesmus subspicatus* koeficijent varijacije prosečnih specifičnih brzina rasta u ponavljanjima sa kontrolnim kulturama tokom ukupnog perioda ispitivanja ne sme biti viši od 7%. Kod ostalih vrsta koje se ređe ispituju ta vrednost ne sme biti viša od 10%.

*1.8. OPIS METODE*

**1.8.1. Aparatura**

Sudovi za ispitivanje i ostala aparatura koja dolazi u dodir sa ispitivanim rastvorima za ispitivanje u potpunosti su izrađeni od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Aparaturu temeljno oprati kako organski i neorganski zagađivači ne bi uticali na rast algi ili na sastav rastvora za ispitivanje.

Posude koje se koriste tokom ispitivanja će po pravilu biti stakleni sudovi dovoljnih dimenzija da se osigura potrebna zapremina kulture za merenja tokom ispitivanja i dovoljan prenos mase CO2 iz atmosfere (videti odeljak 1.8.9. ove metode). Zapremina tečnosti treba da bude dovoljna za analitička određivanja (videti odeljak 1.8.11. ove metode).

Potrebna je sledeća oprema, odnosno delovi opreme:

- Inkubator za gajenje: preporučuje se ormar ili komora u kojoj se može održavati odabrana temperatura inkubacije u granicama ± 2° C.

- Instrumenti za merenje svetla: važno je napomenuti da metoda koja se koristi za merenje intenziteta svetla, a naročito vrsta prijemnika (senzora), može uticati na mernu vrednost. Merenja, ako je moguće, sprovoditi uz pomoć sferičnog prijemnika (4 *π*) (koji reaguje na direktno i reflektovano svetlo iz svih uglova iznad i ispod merne ravni) ili prijemnika 2 *π* (koji reaguje na svetlo iz svih uglova iznad merne ravni).

- Aparat za određivanje biomase algi. Broj ćelija, najčešće korišćeni alternativni parametar za biomasu algi, može se odrediti pomoću elektronskog brojača čestica, mikroskopa sa komorom za brojanje ili protočnog citometra. Ostali se alternativni parametri za biomasu mogu se izmeriti pomoću protočnog citometra, fluorimetra, spektrofotometra i kolorimetra. Korisno je izračunati faktor konverzije broj ćelija - suva masa. Da bi se kod merenja spektrofotometrom dobile korisne merne vrednosti pri niskim koncentracijama biomase, ponekad je potrebno upotrebiti kivete sa dužinom svetlosnog puta od najmanje 4 cm.

**1.8.2. Ispitivani organizmi**

Može se koristiti nekoliko vrsta slobodno plivajućih mikroalgi i cijanobakterija. Za sojeve navedene u Dodatku 1. ove metode dokazano je da su podesni za postupak ispitivanja iz ove metode ispitivanja.

Ako se koriste druge vrste, navesti soj i/ili poreklo. Potrebno je uveriti se da se eksponencijalni rast odabranih ispitivanih algi može održati u preovlađujućim uslovima ispitivanja tokom celokupnog perioda ispitivanja.

**1.8.3. Hranljiva podloga**

Preporučuju se dve alternativne hranljive podloge, OECD i AAP. Sastav tih podloga prikazan je u Dodatku 2. ove metode. Treba napomenuti da te dve podloge imaju različitu početnu pH vrednost i puferski kapacitet (za regulaciju povećanja pH vrednosti). Stoga se kod ispitivanja mogu dobiti različiti rezultati u zavisnosti od podloge koja se koristi, naročito kad se ispituju jonizujuće supstance.

U određenim slučajevima je potrebno izmeniti hranljive podloge, npr. kad se ispituju metali i helatna sredstva, ili kad se ispitivanje sprovodi sa različitim pH vrednostima. Korišćenje izmenjene podloge detaljno se opisuje i obrazlaže**3,4**.

**1.8.4. Početna koncentracija biomase**

Početna biomasa u ispitivanim kulturama jednaka je u svim ispitivanim kulturama i dovoljno niska da se može postići eksponencijalni rast tokom čitavog perioda inkubacije bez bojazni da bi se mogle iscrpiti zalihe hranljivih materija. Početna biomasa ne treba da bude viša od 0,5 mg/l suve mase. Preporučuju se sledeće početne koncentracije ćelija:

|  |  |
| --- | --- |
| *Pseudokirchneriella subcapitata* | 5 × 103-104 ćelija/ml |
| *Desmodesmus subspicatus* | 2-5 × 103 ćelija/ml |
| *Navicula pelliculosa* | 104 ćelija/ml |
| *Anabaena flos-aquae* | 104 ćelija/ml |
| *Synechococcus leopoliensis* | 5 × 104-105 ćelija/ml |

**1.8.5. Koncentracije ispitivane supstance**

Raspon koncentracija u kojem se mogu očekivati efekti supstance može se odrediti na osnovu rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Za konačno glavno ispitivanje odabrati najmanje pet koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu uz faktor koji ne prelazi 3,2. Kod ispitivanih supstanci čija je kriva koncentracija-odgovor ravna, ponekad je opravdano koristiti viši faktor. Serija koncentracija obuhvata područje u kojem se javlja inhibicija rasta algi 5%-75%.

**1.8.6. Ponavljanja i kontrole**

U postavci ispitivanja predvideti po tri ponavljanja za svaku ispitivanu koncentraciju. Ako nije potrebno odrediti NOEC, postavka ispitivanja se može promeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Broj kontrolnih ponavljanja je najmanje tri, a u idealnom slučaju dvostruko veći od broja ponavljanja za svaku ispitivanu koncentraciju.

Za analitička određivanja koncentracija ispitivane supstance može se pripremiti posebna serija rastvora za ispitivanje (videti odeljak 1.8.11. ove metode).

Ako se za rastvaranje ispitivane supstance koristi rastvarač, u postavku ispitivanja se uključuju dodatne kontrole koje sadrže istu koncentraciju rastvarača kao i kod ispitivane kulture.

**1.8.7. Priprema kulture inokuluma**

Da bi se test alge prilagodile uslovima ispitivanja i obezbedilo da alge budu u fazi eksponencijalnog rasta u trenutku kada se koriste za inokulaciju rastvora za ispitivanje, kulturu inokuluma u podlozi za ispitivanje pripremiti 2 do 4 dana pre početka ispitivanja. Biomasu algi podesiti tako da se omogući da preovlada eksponencijalni rast u kulturi inokuluma do početka ispitivanja. Kulturu inokuluma inkubirati u istim uslovima kao ispitivane kulture. Merenjem povećanja biomase u kulturi inokuluma uveriti se da je rast u granicama normale za ispitivani soj u uslovima gajenja. Primer postupka gajenja kulture algi opisan je u Dodatku 3. ove metode. Da bi se izbegla istovremena deoba ćelija za vreme ispitivanja, može biti potrebno sprovesti još jedan korak umnožavanja kulture inokuluma.

**1.8.8. Priprema rastvora za ispitivanje**

Svi rastvori za ispitivanje sadrže istu koncentraciju hranljive podloge i istu početnu biomasu ispitivanih algi. Rastvori za ispitivanje odabranih koncentracija obično se pripremaju mešanjem radnog rastvora ispitivane supstance sa hranljivom podlogom i kulturom inokuluma. Radni rastvori se po pravilu pripremaju rastvaranjem supstanci u podlozi za ispitivanje.

Rastvarači, npr. aceton, *t*-butil alkohol i dimetilformamid mogu da se koriste kao nosači za dodavanje supstanci slabo rastvorljivih u vodi u podlogu za ispitivanje**2,3**. Koncentracija rastvarača ne sme da pređe 100 µl/l i istu koncentraciju dodati svim kulturama (uključujući kontrole) u serijama ispitivanja.

**1.8.9. Inkubacija**

Sudovi za ispitivanje se zatvore vazdušno-propusnim čepovima. Posude se protresu i stave u inkubator za gajenje. Alge tokom ispitivanja držati u suspenziji da se olakša prenos CO2. To se postiže stalnim trešenjem ili mešanjem. Kulture držati na temperaturi u rasponu od 21° C do 24° C uz toleranciju ± 2 °C. Kod vrsta koje nisu navedene u Dodatku 1, npr. tropske vrste, mogu odgovarati više temperature, pod uslovom da se mogu ispuniti kriterijumi validnosti. Preporučuje se da se sudovi nasumično rasporede u inkubatoru i svakodnevno razmeštaju po inkubatoru.

pH vrednost kontrolne podloge se tokom ispitivanja ne sme povećati za više od 1,5 jedinica. Kod metala i jedinjenja koji delimično jonizuju pri pH vrednostima oko ispitivane vrednosti ponekad je nužno ograničiti pomak pH vrednosti kako bi se dobili obnovljivi i dobro definisani rezultati. Pomak od < 0,5 pH jedinica je tehnički izvodljiv i može se postići osiguravanjem odgovarajućeg prenosa mase CO2 iz okolnog vazduha u ispitivani rastvor, npr. povećanjem brzine tresenja. Druga mogućnost je da se smanji potrošnja CO2 smanjenjem početne biomase ili trajanja ispitivanja.

Na površini gde se kulture inkubiraju osigurati neprekidno i ravnomerno fluorescentno osvetljenje npr. tipa hladno belo (cool-white) ili dnevno svetlo (daylight). Različiti sojevi algi i cijanobakterija imaju različite potrebe za svetlošću. Intenzitet svetla prilagoditi ispitivanim organizmima. Za preporučene vrste zelenih algi, intenzitet svetla na nivou rastvora za ispitivanje odabrati u rasponu od 60 do 120 µE·m-2·s-1, mereno u fotosintetički efikasnom spektralnom rasponu od 400 nm do 700 nm primenom odgovarajućeg prijemnika. Neke vrste, posebno *Anabaena flos-aquae*, rastu dobro na svetlu slabijeg intenziteta i jako svetlo ih može oštetiti. Kod tih vrsta odabrati prosečni intenzitet svetla u rasponu od 40 µE·m-2·s-1 do 60 µE·m-2·s-1. (Kod instrumenata za merenje intenziteta svetla baždarenih u luksima, raspon od 4.440 lux do 8.880 lux za hladno belo svetlo približno odgovara preporučenom intenzitetu svetla od 60 µE·m-2·s-1 do 120 µE·m-2·s-1). Intenzitet svetla u prostoru inkubacije ne sme odstupati više od ± 15% od prosečnog intenziteta svetla.

**1.8.10. Trajanje ispitivanja**

Ispitivanje po pravilu traje 72 sata. Ipak, ispitivanje može trajati i duže ili kraće, pod uslovom da mogu da se zadovolje svi kriterijumi validnosti iz odeljka 1.7. ove metode.

**1.8.11. Merenja i analitička određivanja**

Biomasa algi se u svakom sudu određuje najmanje jedanput dnevno tokom ispitivanja. Ako se merenja sprovode na maloj zapremini pipetiranoj iz rastvora za ispitivanje, izvađeni rastvor ne zamenjivati.

Merenje biomase sprovodi se ručnim brojanjem ćelija pod mikroskopom ili elektronskim brojačem čestica (za broj ćelija i/ili biozapreminu). Mogu se koristiti i alternativne tehnike, npr. protočna citometrija, flourescencija hlorofila *in vitro* ili *in vivo***6,7**, ili optička gustina, pod uslovom da se može dokazati zadovoljavajuća korelacija sa biomasom u okviru raspona biomasa koje se javljaju u ispitivanju.

pH vrednost rastvora meri se na početku i na kraju ispitivanja.

Ukoliko je na raspolaganju analitički postupak za određivanje ispitivane supstance u rasponu koncentracija koje se koriste u ispitivanju, analizirati rastvore za ispitivanje kako bi se proverile početne koncentracije i održavanje koncentracija izlaganja tokom ispitivanja.

Analiza koncentracije ispitivane supstance u jednoj niskoj i jednoj visokoj ispitivanoj koncentraciji na početku i kraju ispitivanja i koncentracije oko očekivane vrednosti EC50, može biti dovoljna ukoliko se očekuje da će koncentracije izlaganja tokom ispitivanja odstupati manje od 20% od nominalnih vrednosti. Ako nije verovatno da će koncentracije ostati u okviru 80% do 120% nominalne vrednosti, preporučuje se analiza svih ispitivanih koncentracija na početku i na kraju ispitivanja. U slučaju isparljivih, nestabilnih i jako adsorptivnih ispitivanih supstanci preporučuje se da se tokom perioda izlaganja obave dodatna uzorkovanja i analize u razmacima od 24 sata kako bi se mogao bolje odrediti gubitak ispitivane supstance. Kod takvih supstanci biće potrebna dodatna ponavljanja. U svim slučajevima, koncentraciju ispitivane supstance određivati samo iz jednog ponavljanja za svaki uzorak ispitivane koncentracije (ili u srednjem uzorku koji se dobija sjedinjavanjem sadržaja svih ponavljanja).

Sa podlogama za ispitivanje koje su posebno pripremljene za analizu koncentracija izlaganja tokom ispitivanja postupati jednako kao sa podlogama na kojima se sprovodi ispitivanje tj. inokulisati ih algama i inkubirati u jednakim uslovima. Ako je potrebno da se izvrši analiza koncentracije rastvorene ispitivane supstance, može biti neophodno da se odvoje alge od podloge. Odvajanje se ako je moguće vrši laganim centrifugiranjem gde je g-sila tek tolika da se postigne taloženje algi.

Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane supstance tokom ukupnog trajanja ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20% nominalne ili izmerene početne koncentracije, analiza rezultata se može zasnivati na nominalnim ili izmerenim početnim vrednostima. Ako je odstupanje od nominalne odnosno izmerene početne koncentracije veće od ± 20%, analiza rezultata se zasniva na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tokom izlaganja ili modelima koji opisuju opadanje koncentracije ispitivane supstance**3,8**.

Ispitivanje inhibicije rasta algi je dinamičniji sistem za ispitivanje u odnosu na većinu ispitivanja kratkotrajne toksičnosti u vodi. Stoga je ponekad teško odrediti stvarne koncentracije izlaganja, što naročito važi za ispitivanja adsorptivnih supstanci u niskim koncentracijama. U tom slučaju nestanak supstance iz rastvora adsorpcijom na rastuću biomasu algi ne znači da se ona izgubila iz sistema za ispitivanje. Kada se analizira rezultat ispitivanja, proveriti da li je smanjenje koncentracije ispitivane supstance tokom ispitivanja praćeno smanjenjem inhibicija rasta. Ako je to slučaj, može se razmotriti primena pogodnog modela koji opisuje opadanje koncentracije ispitivane supstance**8**. U protivnom, možda će biti potrebno da se izvrši analiza rezultata na osnovu početnih (nominalnih ili izmerenih) koncentracija.

**1.8.12. Ostala posmatranja**

Na kraju ispitivanja izvršiti mikroskopsko posmatranje da se potvrdi normalan i zdrav izgled kulture inokuluma i uoče eventualne promene u izgledu algi (koje mogu biti posledica izlaganja ispitivanoj supstanci).

**1.8.13. Granično ispitivanje**

U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana supstanca nema toksično delovanje u koncentracijama do 100 mg·l-1 ili do njene granice rastvorljivosti u podlozi za ispitivanje (zavisno od toga šta je manje), može se izvršiti granično ispitivanje koje podrazumeva poređenje odgovora u jednoj kontrolnoj grupi i jednoj ispitivanoj grupi (100 mg·l-1 ili koncentracija jednaka granici rastvorljivosti). Preporučuje se da se uz granično ispitivanje svakako izvrši analiza koncentracije izlaganja. Za granično ispitivanje važe svi gore pomenuti uslovi za ispitivanje i kriterijumi validnosti, s tim da broj ponavljanja u ispitivanoj grupi ne sme biti manji od šest. Promenljive odgovora u kontrolnoj i ispitivanoj grupi mogu se analizirati statističkim testom za poređenje srednjih vrednosti npr. Studentov t-test. Ako su varijanse dve grupe nejednake, izvršiti prilagođeni t-test za nejednake varijanse.

**1.8.14. Modifikacija za jako obojene supstance**

Zračenje (intenzitet svetla) treba da bude u gornjem delu raspona propisanog za ovu metodu ispitivanja: 120µE m-2 s-1 ili više.

Put svetla skratiti smanjenjem zapremine rastvora za ispitivanje (u rasponu od 5 ml do 25 ml).

Treba dovoljno promućkati (na primer umerenim trešenjem) kako bi se obezbedila visoka učestalost izlaganja algi visokom zračenju na površini kulture.

**2. PODACI**

*2.1. GRAFIČKI PRIKAZ KRIVE RASTA*

Biomasa u posudama za ispitivanje može da se izrazi u jedinicama merenog alternativnog parametra (npr. broj ćelija, fluorescencija).

Da bi se dobio grafički prikaz krivih rasta, izraditi tabelu procenjenih koncentracija biomase u ispitivanim i kontrolnim kulturama, zajedno sa koncentracijama ispitivanog materijala, koje se beleže sa rezolucijom od najmanje jednog celog sata, i vremenima merenja. U ovoj prvoj fazi mogu biti korisne i logaritamske i linearne skale, ali su logaritamske skale obavezne i uopšteno daju bolji prikaz promena uzorka rasta u periodu ispitivanja. Treba imati u vidu da kad se eksponencijalni rast prikaže na logaritamskoj skali, kao rezultat se dobije pravac, a nagib pravca pokazuje specifičnu brzinu rasta.

Na grafičkim prikazima proveriti da li kontrolne kulture rastu eksponencijalno i očekivanom brzinom tokom ispitivanja. Treba kritički preispitati sve tačke podataka i izgled grafika i proveriti sirove podatke i postupke kako bi se utvrdile eventualne greške. Posebno proveriti one tačke podataka kod kojih se čini da su odstupanja kao posledica sistemske greške. Ako je očigledno i/ili vrlo verovatno da se radi o greškama u postupku, konkretna tačka se obeležava kao vrednost koja se ne uklapa i isključuje se iz kasnije statističke analize. Nulta koncentracija algi u sudu sa jednim od dva ili tri ponavljanja može ukazivati na to da posuda nije pravilno inokulisana ili da nije bila dobro očišćena). U izveštaju o ispitivanju jasno navesti zašto je neka tačka odbačena kao vrednost koja se ne uklapa. Prihvatljivi razlozi su samo (retke) greške u postupku, ali ne i loša preciznost. Statistički postupci za utvrđivanje vrednosti koje se ne uklapaju imaju ograničenu primenu kod ove vrste problema i ne mogu zameniti stručno prosuđivanje. Vrednosti koje se ne uklapaju (označene kao takve) po mogućstvu zadržati među tačkama podataka koje se prikazuju u kasnijim grafičkim odnosno tabelarnim prikazima podataka.

*2.2. PROMENLJIVE VELIČINE ODGOVORA*

Svrha ispitivanja je da se utvrde efekti ispitivane supstance na rast algi. U ovoj metodi ispitivanja opisane su dve promenljive veličine odgovora, zbog različitog načina regulisanja u državama. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim državama, efekte ocenjivati primenom obe promenljive veličine odgovora:

a) Prosečna specifična brzina rasta: ova promenljiva veličina odgovora izračunava se na osnovu logaritamskog povećanja biomase u periodu ispitivanja, izraženog po danu;

b) Prirast: ova promenljiva veličina odgovora predstavlja razliku između biomase na kraju ispitivanja i početne biomase.

Da bi ova metoda ispitivanja mogla da se primeni izračunavanje rezultata treba da se zasniva na prosečnoj specifičnoj brzini rasta iz razloga navedenih u daljem tekstu. Treba napomenuti da vrednosti toksičnosti izračunate primenom te dve promenljive veličine odgovora nisu uporedive i tu razliku uzeti u obzir kod korišćenja rezultata ispitivanja. Ako su poštovani uslovi ispitivanja ove metode, vrednosti ECx koje se zasnivaju na prosečnoj specifičnoj brzini rasta (ErCx) uopšteno će biti više od rezultata zasnovanih na prirastu (EyCx) zbog razlike u matematičkoj osnovi ta dva pristupa. To ne tumačiti kao razliku u osetljivosti dve promenljive veličine odgovora, već prosto prihvatiti da su te vrednosti matematički različite. Pojam prosečne specifične brzine rasta zasniva se na opštem obrascu eksponencijalnog rasta algi u kulturama koje nisu izložene ograničavajućim faktorima, gde se toksičnost procenjuje na osnovu učinaka na brzinu rasta nezavisno od apsolutne vrednosti specifične brzine rasta u kontrolnoj grupi, nagiba krive koncentracija-odgovor ili trajanja ispitivanja. Za razliku od toga, rezultati koji se zasnivaju na promenljivoj veličini odgovora "prirast" zavise od svih tih drugih promenljivih veličina. EyCx zavisi od specifične brzine rasta vrsta algi koje se koriste u svakom ispitivanju i od maksimalne specifične stope rasta koja se može razlikovati između vrsta, pa čak i između sojeva algi. Ovu promenljivu odgovora ne koristiti za upoređivanje osetljivosti na otrove među vrstama algi, pa čak ni među različitim sojevima. Iako se, sa naučne tačke gledišta, proceni toksičnosti na osnovu prosečne specifične brzine rasta daje prednost, u ovu metodu ispitivanja uključene su i procene na osnovu prirasta kako bi se zadovoljili trenutni regulatorni zahtevi u nekim državama.

**2.2.1. Prosečna brzina rasta**

Prosečna specifična brzina rasta u određenom periodu izračunava se kao logaritamsko povećanje biomase u svakom kontrolnom i ispitivanom sudu primenom jednačine:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *µi-j* = | *lh* Xj - *ln X*i | (dan-1) |
| *t*j *- t*i |

pri čemu:

µi-j jeste prosečna specifična brzina rasta od vremena i do vremena j;

Xi jeste biomasa u vremenu i;

Xj jeste biomasa u vremenu j.

Za svaku ispitivanu i kontrolnu grupu izračunati srednju vrednost brzine rasta sa procenom varijanse.

Izračuna se prosečna specifična brzina rasta za ukupno vreme ispitivanja (obično 0-3. dan); pritom se umesto izmerene početne vrednosti kao početna vrednost uzima nominalna inokulisana biomasa, jer se na taj način po pravilu postiže veća preciznost. Ako oprema koja se koristi za merenje biomase omogućava dovoljno precizno određivanje biomase i kod male biomase inokuluma (npr. protočni citometar), može se koristiti izmerena početna koncentracija biomase. Osim toga, odrediti etapnu brzinu rasta, koja se izračunava kao specifična brzina rasta za svaki dan ispitivanja (0-1, 1-2. i 2-3. dan) i proveriti da li je kontrolna brzina rasta stalna (videti kriterijume validnosti, odeljak 1.7. ove metode). Ako je specifična brzina rasta prvoga dana znatno niža od ukupne prosečne specifične brzine, to može ukazivati na fazu prilagođavanja. Iako faza prilagođavanja u kontrolnim kulturama može da se smanji i gotovo eliminiše pravilnim razmnožavanjem predkulture, kad su u pitanju izložene kulture, faza prilagođavanja može biti znak oporavka nakon prvobitnog toksičnog šoka ili smanjenog izlaganja usled gubitka ispitivane supstance (uključujući sorpciju na biomasu algi) nakon početnog izlaganja. Stoga se može oceniti etapni rast kako bi se ocenili efekti ispitivane supstance koji se javljaju tokom perioda izlaganja. Značajne razlike između etapne brzine rasta i prosečne brzine rasta ukazuju na odstupanje od stalnog eksponencijalnog rasta i upozoravaju da je potrebno detaljno preispitivanje kriva rasta.

Procenat inhibicije brzine rasta za pojedina ponavljanja u ispitivanim grupama izračunava se pomoću jednačine:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %Ir = | µC - µT | x 100 |
| µC |

pri čemu:

%Ir jeste procenat inhibicije prosečne specifične brzine rasta;

µC jeste srednja vrednost prosečne specifične brzine rasta (m) u kontrolnoj grupi;

µT jeste prosečna specifična brzina rasta ponavljanja u ispitivanoj grupi.

Ako se za pripremu rastvora za ispitivanje koriste rastvarači, za izračunavanje procenta inhibicije koristiti kontrole sa rastvaračem, a ne one bez rastvarača.

**2.2.2. Prirast**

Prirast se izračunava kao biomasa na kraju ispitivanja umanjena za početnu biomasu u svakom kontrolnom i ispitivanom sudu. Za svaku ispitivanu koncentraciju i kontrolu izračunati srednju vrednost prirasta sa procenom varijanse. Procenat inhibicije prirasta (% Iy) za pojedinačna ponavljanja u ispitivanoj grupi može se izračunati na sledeći način:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %Ir = | YC - YT | x 100 |
| YC |

pri čemu:

%Iy jeste procenat inhibicije prirasta;

YC jeste srednja vrednost prirasta u kontrolnoj grupi;

YT jeste vrednost prirasta ponavljanja u ispitivanoj grupi.

*2.3 PRIKAZ KRIVE KONCENTRACIJA - ODGOVOR*

Napravi se grafički prikaz procenta inhibicije u odnosu na logaritam koncentracije ispitivane supstance i dobijeni grafik se detaljno pregleda, zanemarujući sve tačke podataka koje su u prvoj fazi izdvojene kao vrednosti koje se ne uklapaju. Kroz tačke podataka povuče se glatka kriva prostim okom ili računarskom interpolacijom, kako bi se dobio prvi utisak odnosa koncentracija-odgovor, i zatim se nastavlja sa detaljnijom metodom, po mogućstvu računarskom statističkom metodom. Zavisno od predviđene upotrebe podataka, kvaliteta (preciznosti) i količine podataka kao i raspoloživosti alata za analizu podataka, može se doneti odluka (koja je ponekad sasvim opravdana) da se u ovoj fazi prekine analiza podataka i jednostavno očitaju ključne vrednosti EC50 i EC10 (i/ili EC20) sa krive povučene prostim okom (videti i odeljak u nastavku o stimulatornim efektima). Neki od validnih razloga za nekorišćenje statističke metode su:

- s obzirom na raspoložive podatke, računarskim metodima ne mogu se dobiti pouzdaniji rezultati od onih koji se mogu dobiti stručnim prosuđivanjem - može se desiti da neki računarski programi uopšte ne daju nikakvo pouzdano rešenje (iteracije ne konvergiraju itd),

- raspoloživi računarski programi nisu podesni za obradu efekata stimulacije rasta (videti u daljem tekstu).

*2.4. STATISTIČKI POSTUPCI*

Cilj je da se dobije kvantitativni odnos koncentracija-odgovor regresionom analizom. Ako se izvrši linearna transformacija podataka odgovora - npr. u jedinice probit, logit ili Vejbulovog modela**9** - može se izvršiti ponderisana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije, koje bolje rešavaju problem neizbežnih nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih raspodela. Približavanjem nultoj ili potpunoj inhibiciji te nepravilnosti mogu transformacijom i dodatno da se povećaju i tako otežaju analizu**9**. Standardne analitičke metode koje koriste probit, logit ili Vejbulove transformacije namenjene su kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i posebno se prilagođavaju da bi se mogle primeniti na podatke o rastu i biomasi. Konkretni postupci za određivanje vrednosti ECx iz kontinuiranih podataka mogu se naći u literaturi**10,11,12**. Korišćenje nelinearne regresione analize detaljnije je opisano u Dodatku 4. ove metode.

Za svaku promenljivu odgovora koja se analizira iz odnosa koncentracija - odgovor izračunati tačke na osnovu kojih se procenjuju vrednosti ECx. Ako je moguće, za sve procene odrediti granice pouzdanosti od 95%. Valjanost podudaranja podataka odgovora sa regresionim modelom procenjuje se grafički ili statistički. Regresionu analizu vršiti na osnovu pojedinačnih odgovora u ponavljanjima, a ne na osnovu srednjih vrednosti ispitivanih grupa. Ukoliko je nelinearno podešavanje krive teško ili nemoguće zbog velike razuđenosti podataka, problem se može zaobići izračunavanjem regresije na srednjim vrednostima po grupama kao praktičnim načinom da se smanji uticaj mogućih vrednosti koje se ne uklapaju. Ako se koristi ova opcija, to navesti u izveštaju o ispitivanju kao odstupanje od uobičajenog postupka uz napomenu da prilagođavanje krive pojedinačnim ponavljanjima nije dalo dobar rezultat.

Ako raspoloživi regresivni modeli/metode nisu podesni za podatke, procene EC50 i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa metodom ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem (bootstrapping)**13**.

Za procenu LOEC, a time i NOEC, u vezi sa efektima ispitivane supstance na brzinu rasta potrebno je uporediti srednje vrednosti obrade primenom tehnika analize varijanse (u daljem tekstu: ANOVA). Zatim srednju vrednost za svaku koncentraciju uporediti sa kontrolnom srednjom vrednošću primenom odgovarajuće metode višestrukog poređenja ili ispitivanja trenda. Ovde može biti koristan Danetov ili Vilijamsov test**14,15,16,17,18**. Treba proveriti da li je pretpostavka homogenosti varijansi ANOVA realna. Procena se može izvršiti grafički ili formalnim testom**18**. Pogodni su Leveneov i Bartletov test. Ako pretpostavka homogenosti varijansi nije zadovoljena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanse prevelika da bi se mogla ispraviti transformacijom, razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonkhereovi "step-down" testovi trenda. Dodatne smernice za određivanje NOEC mogu se naći u literaturi**12**.

Novija naučna saznanja dovela su do preporuke da se pojam NOEC napusti i zameni procenama tačaka ECx dobijenih regresijom. Za ovaj test sa algama nije utvrđena određena vrednost h. Izgleda da je raspon od 10% do 20% odgovarajući (zavisno od odabrane promenljive veličine odgovora), a poželjno je da se navedu obe vrednosti, EC10 i EC20.

*2.5. STIMULACIJA RASTA*

Ponekad se pri niskim koncentracijama može zapaziti stimulacija rasta (negativna inhibicija). To može biti posledica hormezisa (toksička stimulacija) ili unošenja stimulativnih faktora rasta sa ispitivanim materijalom u upotrebljenu minimalnu podlogu. Treba imati u vidu da dodavanje neorganskih hranljivih materija ne bi smelo da ima nikakav direktan uticaj budući da podloga koja se koristi tokom ispitivanja treba stalno da sadrži višak hranljivih supstanci. Stimulacija pri niskim dozama se po pravilu može zanemariti kod izračunavanja EC50 osim ako je ona ekstremno visoka. U slučaju ektremne stimulacije, ili kad je potrebno izračunati ECx za niske vrednosti h, ponekad je potrebno primeniti posebne postupke. Brisanje stimulativnih odgovora iz analize podataka izbegavati, a ako raspoloživi softver za prilagođavanje krive ne može da prihvati male vrednosti stimulacije, može se koristiti linearna interpolacija sa metodom ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem (bootstrapping). U slučaju ekstremne stimulacije može se razmotriti primena hormezis modela**19**.

*2.6. NETOKSIČNA INHIBICIJA RASTA*

Ispitivani materijali koji apsorbuju svetlo mogu izazvati smanjenje brzine rasta jer stvaranje senke smanjuje raspoloživu količinu svetla. Ove i druge slične fizičke efekte odvojiti od toksičnih efekata izmenom uslova ispitivanja i posebno ih navesti u izveštaju o ispitivanju. Smernice se mogu pronaći u literaturi**2,3**.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- agregatno stanje i relevantna fizičko-hemijska svojstva, uključujući granicu rastvorljivosti u vodi,

- podaci za identifikaciju hemikalije, uključujući čistoću.

2) Ispitivanoj vrsti:

- soj, dobavljač odnosno izvor i uslovi gajenja.

3) Uslovima ispitivanja:

- datum početka i trajanje ispitivanja;

- opis ispitivanja: sudovi za ispitivanje, zapremine kulture, gustina biomase na početku ispitivanja;

- sastav podloge;

- ispitivane koncentracije i ponavljanja (npr. broj ponavljanja, broj ispitivanih koncentracija i primenjena geometrijska progresija);

- opis pripreme rastvora za ispitivanje, uključujući primenu rastvarača itd.;

- inkubator za gajenje;

- intenzitet i kvalitet svetla (izvor, homogenost);

- temperatura;

- ispitivane koncentracije: nominalne ispitivane koncentracije i rezultati analiza za određivanje koncentracije ispitivane supstance u posudama za ispitivanje. Treba navesti efikasnost metode i granicu kvantifikacije u ispitivanom matriksu;

- sva odstupanja od ove metode ispitivanja;

- metod određivanja biomase i dokaz korelacije između izmerenog parametra i suve mase.

4) Rezultatima:

- pH vrednosti na početku i kraju ispitivanja u svim obradama;

- biomasa svake tikvice u svakoj mernoj tački i metod merenja biomase;

- krive rasta (grafički prikaz biomase u zavisnosti od vremena);

- izračunate promenljive odgovora za svako ponavljanje, uključujući srednje vrednosti i koeficijent varijacije za ponavljanja;

- grafički prikaz odnosa koncentracija/efekat;

- procene toksičnosti za promenljive odgovora, npr. EC50, EC10, EC20 i odgovarajući intervali poverenja. Ako se izračunavaju LOEC i NOEC, njihove vrednosti i statističke metode koje su upotrebljene za određivanje;

- ako se koristi ANOVA, veličina efekta koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika);

- eventualna stimulacija rasta u bilo kojem uzorku;

- svi ostali zapaženi efekti, npr. morfološke promene algi;

- tumačenje rezultata, uključujući mogući uticaj odstupanja od metode ispitivanja na rezultate ispitivanja.

**4. LITERATURA**

1. OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

2. ISO 1998: Water quality - Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

4. ISO 1998: Water quality - Sampling - Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality - Algal growth inhibition test. ISO 8692.

6. Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

7. Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925.

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

9. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

10. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

11. Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

12. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

15. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

16. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

17. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

18. Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

19. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

**Deo drugi**

**DODATAK 1.**

SOJEVI KOJI SU SE POKAZALI POGODNIM ZA ISPITIVANJE

Zelene alge

- *Pseudokirchneriella subcapitata*, (ranije poznata kao *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

- *Desmodesmus subspicatus* (ranije poznata kao *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Dijatomeje

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cijanobakterije

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Izvori sojeva

Preporučeni sojevi raspoloživi su u kulturama jedne vrste algi iz sledećih zbirki (abecednim redom):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

SJEDINJENE AMERIČKE DRŽAVE

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UJEDINJENO KRALJEVSTVO

SAG: Collection of Algal Cultures

Inst. Plant Physiology

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18

3400 Göttingen

NEMAČKA

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

SJEDINJENE AMERIČKE DRŽAVE

Tabela: Izgled i svojstva preporučenih vrsta

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | *P. subcapitata* | *D. subspicatus* | *N. pelliculosa* | *A. flos-aquae* | *S. leopoliensis* |
| Izgled | Zakrivljene, uvijene, pojedinačne ćelije | Duguljaste, većinom pojedinačne ćelije | Štapićaste | Lanci duguljastih ćelija | Štapićaste |
| Veličina (D × Š)\* µm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Zapremina ćelija (µm3/ćelija) | 40-60 [1] | 60-80 [1] | 40-50 [1] | 30-40 [1] | 2,5 [2] |
| Suva masa ćelija (mg/ćelija) | 2-3 × 10-8 | 3-4 × 10-8 | 3-4 × 10-8 | 1-2 × 10-8 | 2-3 × 10-9 |
| Brzina rasta [3] dan-1) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0-2,4 |
| [1] Mereno elektronskim brojačem čestica. [2] Izračunato iz veličine. [3] Najčešće zapažena brzina rasta u OECD podlozi pri intenzitetu svetla oko 70 µE·m-2·s-1 i temperaturi 21°C. \* D × Š jeste dužina puta širina. | | | | | |

Posebne preporuke za gajenje i rukovanje preporučenim ispitivanim vrstama

*Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus*

Ove zelene alge generalno se lako održavaju u različitim podlogama kulture. Informacije o pogodnim podlogama mogu se dobiti u zbirkama kultura. Po pravilu se radi o pojedinačnim ćelijama i merenja gustine ćelija mogu se jednostavno obaviti uz pomoć elektronskog brojača čestica ili mikroskopa.

*Anabaena flos-aquae*

Za držanje radne kulture mogu se koristiti različite hranljive podloge. Posebno je važno da se ne dozvoli da šaržna kultura kod obnavljanja ne prođe logaritamsku fazu rasta jer je tada regeneracija teška.

*Anabaena flos-aquae* stvara skupine isprepletenih lanaca ćelija. Veličina skupina može biti različita, zavisno od uslova gajenja. Skupine ponekad razbiti ako se biomasa određuje brojanjem pod mikroskopom ili elektronskim brojačem čestica.

Da bi se smanjila varijabilnost rezultata brojanja, lanci se mogu razbiti ultrazvučnom obradom poduzoraka. Ultrazvučna obrada ne sme trajati duže nego što je potrebno da se lanci razbiju na kraće lance, jer se u protivnom ćelije mogu uništiti. Intenzitet i trajanje ultrazvučne obrade jednaki su kod svih uzoraka.

Na hemocitometru izbrojati dovoljan broj polja (najmanje 400 ćelija) da bi se smanjila odstupanja. Time se poboljšava pouzdanost mikroskopskih određivanja gustine.

Nakon što se lanci ćelija razbiju pažljivom ultrazvučnom obradom, za određivanje ukupne količine ćelija *Anabaena* može se koristiti elektronski brojač čestica. Ultrazvučnu energiju podesiti tako da se izbegne oštećenje ćelija.

Da bi se dobila dobro izmešana i homogena suspenzija algi za inokulaciju posuda za ispitivanje, koristiti mešalicu bez odbojnika ("vorteks") ili sličan odgovarajući postupak.

Sudove za ispitivanje staviti na rotacionu ili horizontalnu tresilicu na oko 150 obrtaja u minuti. Drugi način da se smanji tendencija stvaranja grudvica kod *Anabaena* je periodično mućkanje. Kod pojave grudvica paziti da se za merenje biomase dobiju reprezentativni uzorci. Ponekad je pre uzorkovanja potrebno snažno protresti sudove da bi se razbile grudvice algi.

*Synechococcus leopoliensis.*

Za držanje radne kulture mogu se koristiti različite hranljive podloge. Informacije o pogodnim podlogama mogu se dobiti u zbirkama kultura.

*Synechococcus leopoliensis* raste u obliku pojedinačnih štapićastih ćelija. Ćelije su veoma male, što otežava merenje biomase brojanjem pod mikroskopom. Ovde mogu da pomognu elektronski brojači čestica opremljeni za brojanje čestica do veličine od oko 1 µm. Osim toga, mogu se koristiti fluorometrijska merenja *in vitro*.

*Navicula pelliculosa*

Za držanje radne kulture mogu se koristiti različite hranljive podloge. Informacije o pogodnim podlogama mogu se dobiti u zbirkama kultura. Voditi računa o tome da podloga sadrži silikat.

*Navicula pelliculosa* može u određenim uslovima rasta da stvara naslage. Ćelije algi ponekad imaju tendenciju da se nakupljaju u površinskoj emulziji zbog proizvodnje lipida. U tim okolnostima kod uzimanja poduzoraka za određivanje biomase preduzimaju se posebne mere da bi se dobili reprezentativni uzorci. Ponekad je potrebno i snažno protresanje npr. uz pomoć mešalice bez odbojnika ("vorteks").

**DODATAK 2.  
HRANLJIVE PODLOGE**

Može se koristiti jedna od dve hranljive podloge:

Podloga OECD TG 201 jeste izvorna podloga Uputstva za ispitivanje OECD 201, takođe je u skladu sa standardom ISO 8692.

Podloga AAP US. EPA takođe je u skladu sa standardom ASTM.

Kod pripreme ovih podloga koristiti hemikalije čistoće PA ("pro analysis") odnosno hemikalije analitičke čistoće i dejonizovanu vodu.

Tabela: Sastav podloge AAP (US. EPA) i podloge OECD TG 201

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Sastojak | EPA | | OECD | |
| mg/l | mM | mg/l | mM |
| NaHCO3 | 15,0 | 0,179 | 50,0 | 0,595 |
| NaNO3 | 25,5 | 0,300 |  |  |
| NH4Cl |  |  | 15,0 | 0,280 |
| MgCl2·6(H2O) | 12,16 | 0,0598 | 12,0 | 0,0590 |
| CaCl2·2(H2O) | 4,41 | 0,0300 | 18,0 | 0,122 |
| MgSO4·7(H2O) | 14,6 | 0,0592 | 15,0 | 0,0609 |
| K2HPO4 | 1,044 | 0,00599 |  |  |
| KH2PO4 |  |  | 1,60 | 0,00919 |
| FeCl3·6(H2O) | 0,160 | 0,000591 | 0,0640 | 0,000237 |
| Na2EDTA·2(H2O) | 0,300 | 0,000806 | 0,100 | 0,000269 [\*] |
| H3BO3 | 0,186 | 0,00300 | 0,185 | 0,00299 |
| MnCl2·4(H2O) | 0,415 | 0,00201 | 0,415 | 0,00210 |
| ZnCl2 | 0,00327 | 0,000024 | 0,00300 | 0,0000220 |
| MnCl2·4(H2O) | 0,00143 | 0,000006 | 0,00150 | 0,00000630 |
| Na2MoO4·2(H2O) | 0,00726 | 0,000030 | 0,00700 | 0,0000289 |
| CuCl2.2(H2O) | 0,000012 | 0,00000007 | 0,00001 | 0,00000006 |
| pH | 7,5 | | 8,1 | |
| [\*] Molarni odnos EDTA - gvožđe je nešto veći od jedan. Time se sprečava taloženje gvožđa i istovremeno smanjuje heliranje teških metalnih jona. | | | | |

Kod ispitivanja sa dijatomejom *Navicula pelliculosa* obe podloge dopuniti sa Na2SiO3·9H2O tako da se dobije koncentracija od 1,4 mg Si/l.

pH vrednost podloge određuje se kad se uspostavi karbonatna ravnoteža između podloge i CO2 u atmosferskom vazduhu. Približni odnos između pH na 25 °C i molarne koncentracije bikarbonata proizlazi iz formule:

*pHeq* = 11,30 + *log* [*HCO3*]

Kod 15 mg NaHCO3, pHeq = 7,5 (podloga U.S. EPA), a kod 50 mg NaHCO3/l, pHeq = 8,1 (podloga OECD).

Tabela: Elementarni sastav podloga za ispitivanje

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Element | EPA | OECD |
| mg/l | mg/l |
| C | 2,144 | 7,148 |
| N | 4,202 | 3,927 |
| P | 0,186 | 0,285 |
| K | 0,469 | 0,459 |
| Na | 11,044 | 13,704 |
| Ca | 1,202 | 4,905 |
| Mg | 2,909 | 2,913 |
| Fe | 0,033 | 0,017 |
| Mn | 0,115 | 0,115 |

Tabela: Priprema podloge OECD

|  |  |
| --- | --- |
| Hranljiva materija | Koncentracija u radnom rastvoru |
| Radni rastvor 1: makronutrijenti | |
| NH4Cl  MgCl2·6H2O  CaCl2·2H2O  MgSO4·7H2O  KH2PO4 | 1,5 g·l-1  1,2 g·l-1 1,8 g·l-1  1,5 g·l-1 0,16 g·l-1 |
| Radni rastvor 2: gvožđe | |
| FeCl3·6H2O  Na2EDTA·2H2O | 64 mg·l-1 100 mg·l-1 |
| Radni rastvor 3: elementi u tragovima | |
| H3BO3 MnCl2·4H2O  ZnCl2 CoCl2·6H2O  CoCl2·6H2O  CuCl2·2H2O  Na2MoO4·2H2O | 185 mg·l-1 415 mg·l-1 3 mg·l-1 1,5 mg·l-1 0,01 mg·l-1 7 mg·l-1 |
| Radni rastvor 4: bikarbonat | |
| NaHCO3 Na2SiO3·9H2O | 50 g·l-1 |

Radni rastvori se sterilišu membranskom filtracijom (srednji prečnik pora 0,2 µm) ili obradom u autoklavu (120° C, 15 min). Rastvori se čuvaju u mraku na temperaturi od 4° C.

Radni rastvori 2 i 4 ne sterilišu se u autoklavu, već isključivo membranskom filtracijom.

Hranljiva podloga priprema se dodavanjem odgovarajuće zapremine radnih rastvora 1-4 u vodu, i to:

U 500 ml sterilisane vode doda se:

- 10 ml radnog rastvora 1,

- 1 ml radnog rastvora 2,

- 1 ml radnog rastvora 3,

- 1 ml radnog rastvora 4.

Dopuni se sterilizovanom vodom do 1000 ml.

Treba ostaviti dovoljno vremena za uspostavljanje ravnoteže između podloge i atmosferskog CO2, prema potrebi uduvavanjem sterilnog filtriranog vazduha u trajanju od nekoliko sati.

Priprema podloge AAP

1.1. U približno 900 ml dejonizovane ili destilovane vode doda se po 1 ml radnih rastvora iz A1.2.1. - A1.2.7. i razblaži do 1 l.

A1.2. Pripremi se radni rastvori sa makronutrijentima rastvaranjem sledećih količina supstance u 500 ml dejonizovane ili destilovane vode. Reagensi A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3. i A1.2.4. se mogu objediniti u jedan radni rastvor.

A1.2.1. NaNO3 - 12,750 g.

A1.2.2. MgCL2·6H2O - 6,082 g.

A1.2.3. CaCl2·2H2O - 2,205 g.

A1.2.4. Radni rastvor sa mikronutrijentima - (videti napomenu A1.3. ove metode).

A1.2.5. MgSO4 7H2O - 7,350 g.

A1.2.6. K2HPO4 - 0,522 g.

A1.2.7. NaHCO3 - 7,500 g.

A1.2.8. Na2SiO3·9H2O - videti napomenu A1.1.

Napomena A1.1. - Koristiti samo kod ispitivanja s dijatomejama. Može se dodati direktno (202,4 mg) ili putem radnog rastvora tako da se dobije konačna koncentracija 20 mg/l Si u podlozi.

A1.3. Pripremi se radni rastvor sa makronutrijentima rastvaranjem sledećih količina supstance u 500 ml dejonizovane ili destilovane vode.

A1.3.1. H3BO3 - 92,760 mg.

A1.3.2. MnCl2·4H2O - 207,690 mg.

A1.3.3. ZnCl2 - 1,635 mg.

A1.3.4. FeCl3·6H2O - 79,880 mg.

A1.3.5. CoCl2·6H2O - 0,714 mg.

A1.3.6. Na2MoO4·2H2O - 3,630 mg.

A1.3.7. CuCl2·2H2O - 0,006 mg.

A1.3.8. Na2EDTA·2H2O - 150,000 mg.

[dinatrijum-etilendiamintetraacetat].

A1.3.9. Na2SeO4·5H2O-0,005 mg videti napomenu A1.2

Napomena A1.2 Koristiti samo u podlozi za radne kulture sa dijatomejama.

A1.4. pH podesiti na 7,5 ± 0,1 sa 0,1 N ili 1,0 N NaOH ili HCl.

A1.5. Podloga se profiltrira u sterilnu posudu kroz membranski filter 0,22 μm, ako se koristi brojač čestica, ili kroz membranski filter 0,45-μm, ako se ne koristi brojač čestica.

A1.6. Podloga se do upotrebe čuva u mraku na temperaturi od oko 4° C.

**DODATAK 3.  
PRIMER POSTUPKA ZA GAJENJE KULTURE ALGI**

**Opšte napomene**

Gajenje kultura u skladu sa ovim postupkom sprovodi se radi dobijanja kultura algi za toksikološka ispitivanja.

Treba koristiti odgovarajuće metode kako se kulture algi ne bi kontaminirale bakterijama. Aksenične kulture mogu biti poželjne, ali se uspostavljaju i koriste kulture koje sadrže samo jednu vrstu algi.

Sve postupke obavljati u sterilnim uslovima kako bi se izbeglo zagađenje bakterijama i drugim algama.

**Oprema i materijali**

Videti Deo prvi ove metode, odeljak 1.8.1.

**Postupci za dobijanje kultura algi**

*Priprema hranljivih rastvora (podloga)*

Sve hranljive soli podloge pripremaju se kao koncentrovani radni rastvori i čuvaju na tamnom i hladnom mestu. Ovi rastvori se sterilišu filtracijom ili obradom u autoklavu.

Podloga se priprema dodavanjem odgovarajuće količine radnog rastvora u sterilnu destilovanu vodu, pazeći da ne dođe do infekcije. Kod čvrstih podloga dodaje se 0,8% agara.

*Radna kultura*

Radne kulture su male kulture algi koje se redovno presejavaju u svežu podlogu i koriste kao polazni ispitivani materijal. Ako se kulture ne koriste redovno, one se nanose na kosi agar. Kulture se presejavaju u svežu podlogu najmanje jedanput u dva meseca.

Radne kulture se gaje u erlenmajerima koji sadrže odgovarajuću podlogu (oko 100 ml). Kada se alge inkubiraju na 20° C uz neprekidno osvetljenje, potrebno je nedeljno presejavanje.

Kod presejavanja, određena količina "stare" kulture se prenese sterilnim pipetama u sud sa svežom podlogom tako da kod brzorastućih vrsta početna koncentracija bude oko 100 puta niža nego u staroj kulturi.

Brzina rasta vrste može se odrediti iz krive rasta. Ako je ona poznata, moguće je proceniti gustinu pri kojoj kulturu preneti u novu podlogu. To se čini pre nego što kultura dostigne fazu odumiranja.

*Predkultura*

Predkultura treba da da određenu količinu algi koje su pogodne za inokulaciju ispitivanih kultura. Predkultura se inkubira u uslovima ispitivanja i koristi dok još eksponencijalno raste, po pravilu nakon perioda inkubacije od 2 dana do 4 dana. Kulture algi koje sadrže deformisane ili abnormalne ćelije odbaciti.

**DODATAK 4.  
ANALIZA PODATAKA NELINEARNOM REGRESIJOM**

**Opšte napomene**

Kod ispitivanja sa algama i drugih ispitivanja mikrobiološkog rasta - rasta biomase odgovor je po prirodi stvari kontinuirana ili metrička promenljiva: brzina procesa, ako se koristi brzina rasta, odnosno njen vremenski integral, ako je odabrana biomasa. Oba parametra se stavljaju u odnos prema odgovarajućem srednjem odgovoru ponavljanja neizloženih kontrola koje najjače reaguju na date uslove - u ispitivanju sa algama najvažniji faktori su svetlost i temperatura. Sistem je podeljen ili homogen, a biomasa se može posmatrati kao kontinuum bez razmatranja pojedinačnih ćelija. Raspodela varijanse za odgovore kakvi se javljaju kod ovakvih sistema zavisi isključivo od probnih faktora (koji se obično opisuju putem log-normalnih ili normalnih raspodela greške). To je u suprotnosti sa tipičnim odgovorima kod bioanalize sa kvantalnim podacima, gde se tolerancija (po pravilu sa binomnom raspodelom) pojedinačnih organizama često smatra dominantnom komponentom varijanse. Ovde su odgovori kontrola nula ili na nivou osnovne vrednosti.

U najjednostavnijem slučaju normirani odnosno relativni odgovor, *r*, ravnomerno opada od 1 (nulta inhibicija) do 0 (stopostotna inhibicija). Treba zapaziti da su svi odgovori povezani sa greškom i da se očigledne negativne inhibicije mogu izračunati samo kao rezultat slučajne greške.

**Regresiona analiza**

*Modeli*

Cilj regresione analize je da se kvantitativno opiše kriva koncentracija-odgovor u obliku matematičke regresione funkcije *Y* = *f* (*C*) ili češće *F* (*Z*), gde je *Z* = *log C*. Inverzna funkcija *C* = *f*-1 (*Y*) omogućava izračunavanje vrednosti ECx, uključujući EC50, EC10 i EC20 i njihove granice pouzdanosti od 95%. Pokazalo se da nekoliko jednostavnih matematičkih funkcija uspešno opisuju odnose koncentracija-odgovor koji se dobijaju u ispitivanjima inhibicije rasta algi. Te funkcije obuhvataju npr. logističku jednačinu, nesimetričnu Vejbulovu jednačinu i funkciju log-normalne raspodele, koje sve predstavljaju sigmoidne krive koje se asimptotski približavaju vrednosti 1 kad C → 0 i nuli kad C → beskonačno.

U poslednje vreme, kao alternativa asimptotskim modelima predlaže se korišćenje modela neprekinute funkcije s pragom (npr. Kojmanov model "inhibicije rasta populacije", Kooijman *et al*., 1996). Kod ovog modela polazi se od pretpostavke da u koncentracijama ispod određenog praga (EC0+) nema nikakvih efekata; EC0+ se procenjuje ekstrapolacijom odnosa koncentracija - odgovor sa presekom u osi koncentracije primenom jednostavne neprekinute funkcije, koja nije diferencijabilna u polaznoj tački.

Treba zapaziti da se analiza može pojednostaviti metodom najmanjih kvadrata (uz pretpostavku stalne varijanse) ili ponderisanih kvadrata, ako se ispravlja heterogenost varijanse.

*Postupak*

Postupak se može ukratko opisati na sledeći način: odabere se odgovarajuća funkcionalna jednačina, *Y* = *f* (*C*), i prilagodi podacima nelinearnom regresijom. Poželjno je da se umesto srednjih vrednosti ponavljanja koriste merenja pojedinačnih uzoraka/sudova kako bi se iz podataka izvuklo što je moguće više informacija. Sa druge strane, ako je varijansa visoka, praktična iskustva pokazuju da srednje vrednosti ponavljanja mogu dati pouzdaniju matematičku procenu uz manji uticaj sistemskih problema nego što je to slučaj kada se zadrže pojedinačne tačke.

Napravi se grafički prikaz podešene krive i izmerenih vrednosti i proveri da li je podešavanje ispravno obavljeno. Ovde se naročito korisnom može pokazati analiza reziduala. Ako funkcionalni odnos koji je odabran za prilagođavanje krive koncentracija-odgovor ne opisuje dobro čitavu krivu ili neki njen bitni deo, npr. odgovor pri niskim koncentracijama, za prilagođavanje krive izabrati neku drugu opciju - npr. nesimetrična kriva Vejbul funkcije umesto simetrične. Negativne inhibicije mogu da predstavljaju problem npr. kod funkcije log-normalne raspodele, i da zahtevaju da se upotrebi i alternativna regresiona funkcija. Nije preporučljivo da se tim negativnim vrednostima dodeli vrednost nula ili mala pozitivna vrednost jer se time iskrivljuje raspodela grešaka. Ponekad je primereno napraviti posebno prilagođavanje određenih delova krive, npr. deo krive sa niskom inhibicijom kako bi se dobila procena vrednosti EClow x. Iz prilagođene jednačine se izračunaju ("inverznom procenom" *C* = *f*-1 (*Y*)) karakteristične procene tačaka ECx i dokumentuje najmanje EC50 i jedna ili dve procene EClow x. Iskustva sa praktičnim ispitivanjima pokazuju da je test sa algama dovoljno precizan da se po pravilu može dobiti dovoljno tačna procena kod inhibicije od 10%, pod uslovom da su tačke podataka dovoljne - osim ako se pri niskim koncentracija javlja stimulacija rasta kao faktor prilagođavanja. Preciznost procene EC20 često je znatno veća od EC10 jer je EC20 obično smešten u približno linearnom delu centralne krive koncentracija-odgovor. Ponekad se EC10 teško tumači zbog stimulacije rasta. Prema tome, iako se EC10 po pravilu može dobiti sa dovoljnom tačnošću, preporučuje se da se uz njega uvek navede i EC20.

*Ponderi*

Varijansa eksperimenta uopšteno nije stalna i obično uključuje proporcionalnu komponentu; stoga je uvek dobro izvršiti ponderisanu regresiju.

*Wi = 1/Var(ri)*

Mnogi regresioni programi nude mogućnost ponderisane regresione analize primenom pondera koji su navedeni u tabeli. Ponderi se radi jednostavnosti normiraju množenjem sa n/S wi (*n* je broj tačaka podataka) tako da njihov zbir bude 1.

*Normalizovanje odgovora*

Normalizovanjem srednjeg odgovora kontrola javljaju se neki temeljni problemi i dobija prilično komplikovana struktura varijanse. Deljenjem odgovora sa srednjim odgovorom kontrola da bi se dobio procenat inhibicije uvodi se dodatna greška koja proizlazi iz greške srednje kontrolne vrednosti. Osim u slučaju kad je ta greška zanemarljivo mala, ponderi regresije i granice pouzdanosti ispravljaju se za kovarijansu sa kontrolom**17**. Ovde je važna preciznost procene srednje vrednosti kontrolnih odgovora kako bi se smanjila ukupna varijansa relativnog odgovora.

Napomena: indeks i se odnosi na koncentraciju *i*, a indeks 0 na kontrolu.

*Y*i = relativni odgovor = *r*i/*r*0 = 1 - *I* = **(*C*i)

uz varijansu:

*Var(Yi) = Var(ri / r0)  (Yi / ri)2 Var(ri) + (Yi / r0)2 x Var(r0)*

budući da je:

(Yi / ri) = 1 / r0 i (Yi / r0) = ri / r0

uz normalnu raspodelu podataka i ponavljanja mi i m0:

*Var(ri) = σ2/mi*

ukupna varijansa relativnog odgovora *Y*i je prema tome:

*Var(Yi) = σ2/(r02 mi)+ri2 x σ2/ro4 m0*

Greška srednje kontrolne vrednosti je obrnuto proporcionalna kvadratnom korenu broja prosečnih kontrolnih ponavljanja i stoga je ponekad opravdano uključiti podatke iz ranijih ispitivanja, čime se može znatno smanjiti greška. Alternativni postupak je da se umesto normiranja podataka i prilagođavanja apsolutnih odgovora uključujući podatke o kontrolnim odgovorima, kontrolni odgovor uvede kao dodatni parametar koji se prilagođava nelinearnom regresijom. Ova metoda uz uobičajenu jednačinu regresije sa 2 parametra zahteva prilagođavanje 3 parametra, tako da je potrebno više tačaka podataka nego što je to slučaj kod nelinearne regresije podataka normiranih korišćenjem unapred definisanog kontrolnog odgovora.

*Inverzni intervali pouzdanosti*

Izračunavanje intervala poverenja nelinearne regresije inverznom procenom je prilično složeno i ne predstavlja standardnu opciju u uobičajenim statističkim računarskim programskim paketima. Približne granice pouzdanosti mogu se dobiti standardnim programima nelinearne regresije sa reparametrizacijom (Brus i Versteeg, 1992), što podrazumeva preradu matematičke jednačine tako da se na mesto parametara za procenu uvrste željene procene tačaka, npr. EC10 i EC50. (Ako je funkcija I = *f* (*α, β*, koncentracija), funkciju *f* (*α, β*, koncentracija) zameniti identičnom funkcijom g (EC10, EC50, koncentracija), koristeći definicijske odnose *f* (α*, β*, EC10) = 0,1 and *f* (*α, β*, EC50) = 0,5.

Direktnije izračunavanje dobija se ako se zadrži izvorna jednačina i upotrebi Tejlorov razvoj oko srednjih vrednosti *r*i i *r*0.

U poslednje vreme postale su popularne metode ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem ("bootstrap" metode). Te metode uključuju procenu empirijske raspodele varijanse na osnovu izmerenih podataka i učestalog uzorkovanja primenom generatora slučajnih brojeva.

**Literatura**

1. Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

2. Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494.

3. Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420

**C.4. ODREĐIVANJE BRZE BIORAZGRADLJIVOSTI**

**Deo prvi**

**1. OPŠTA RAZMATRANJA**

*1.1. UVOD*

Za trijažu hemikalija prema brzoj biorazgradljivosti u aerobnom vodenom medijumu koriste se sledeće metode ispitivanja:

1. Nestajanje DOC (Metoda C.4-A);

2. Modifikovana OECD trijaža - Nestajanje DOC (Metoda C.4-B);

3. Razvijanje metode C.4-B (Modifikovani Sturm test) (Metoda C.4-C);

4. Manometrijska respirometrija (Metoda C.4-D);

5. Ispitivanje u zatvorenoj boci (Metoda C.4-E);

6. MITI ispitivanje (Metoda C.4-F).

Opšta i zajednička razmatranja svih šest metoda data su u odeljku 1. U odeljku 2. do 7. dati su posebni detalji za pojedine metode. Prilozi sadrže definicije, formule i uputstva.

Međulaboratorijsko poređenje, koje je 1988. godine sproveo OECD, pokazalo je da metode daju postojane rezultate. Zavisno od fizičkih svojstava ispitivane hemikalije, prioritet ima jedna ili druga metoda.

*1.2. DEFINICIJE*

Rastvoreni kiseonik (Dissolved Oxygen, u daljem tekstu: DO) jeste koncentracija kiseonika rastvorenog u uzorku vode, izražava se u mg/l.

Biohemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: BPK) jeste količina kiseonika koju utroše mikroorganizmi pri razgradnji ispitivanog jedinjenja, izražava se u gramima. BPK se takođe izražava kao gram potrošenog kiseonika po gramu ispitivanog jedinjenja (videti Metodu C.5. koja je data u ovom prilogu).

Hemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: HPK) jeste količina kiseonika potrošenog u toku oksidacije ispitivanog jedinjenja sa vrućim, kiselim bihromatom; daje meru količine prisutne supstance koja oksidiše. Izražava se u gramima, i kao gram kiseonika potrošenog po gramu ispitivanog jedinjenja.

Rastvoreni organski ugljenik (Dissolved Organic Carbon, u daljem tekstu: DOC) jeste organski ugljenik prisutan u rastvoru ili onaj koji prolazi kroz 0,45 *µ* filter ili ostaje u supernatantu nakon centrifugiranja na 40.000 m/s2 (± 4000 g) u toku 15 minuta.

Teoretska potrošnja kiseonika (Theoretical Oxygen Demand, u daljem tekstu: ThOD) jeste ukupna količina kiseonika (u mg) potrebna da se hemikalija potpuno oksidiše. Izračunava se iz molekulske formule (videti odeljak 2.2. ove metode) i takođe se izražava u mg potrebnog kiseonika po mg ispitivanog jedinjenja.

Teoretski ugljen-dioksid (Theoretical Carbon Dioxide, u daljem tekstu: ThC.4-B) jeste izračunata količina CO2 (u mg), koja nastaje iz poznatog ili izmerenog sadržaja ugljenika u ispitivanom jedinjenju, kada se ono u potpunosti mineralizuje; takođe se izražava u mg ugljen-dioksida po mg ispitivanog jedinjenja.

Ukupni organski ugljenik (Total Organic Carbon, u daljem tekstu: TOC) uzorka jeste suma organskog ugljenika u rastvoru i onog u suspenziji.

IC (Inorganic Carbon) jeste neorganski ugljenik.

Ukupni ugljenik (Total Carbon, u daljem tekstu: TC) jeste suma organskog i neorganskog ugljenika prisutnog u uzorku.

MITI (Ministry Of International Trade And Industry, Japan) jeste Ministarstvo međunarodne trgovine i industrije Japana.

Primarna biorazgradnja jeste promena u hemijskoj strukturi supstance izazvana biološkim delovanjem, koja dovodi do gubitka specifičnog svojstva te supstance.

Potpuna biorazgradnja (aerobna) jeste nivo razgradnje koji se postiže kada ispitivano jedinjenje u potpunosti iskoriste mikroorganizmi, pri čemu nastaju ugljen-dioksid, voda, mineralne soli i nove ćelijske strukture (biomase).

Brzo biorazgradljiva supstanca jeste arbitrarna klasifikacija hemikalija koje su prošle određene specifične skrining testove za potpunu biorazgradljivost. Ovi testovi su toliko striktni da se smatra da se takva jedinjenja brzo i potpuno biorazgrađuju u vodenoj životnoj sredini pri aerobnim uslovima.

Inherentno biorazgradljiva supstanca jeste klasifikacija hemikalija za koje, na osnovu ispitivanja biorazgradljivosti, postoji nedvosmislen dokaz da podležu biorazgradnji (primarnoj ili potpunoj).

Uklonjivost jeste podložnost jedinjenja uklanjanju putem biološkog prečišćavanja otpadnih voda, bez negativnog uticaja na uobičajeni proces obrade otpadnih voda. Brzo biorazgradljiva jedinjenja se mogu ukloniti, ali ne i sva inherentno biorazgradljiva jedinjenja. Procesu uklanjanja mogu doprineti i abiotički procesi.

Vreme kašnjenja jeste vreme od inokulacije, u ispitivanju nestanka, pa do momenta kada razgradnja dostigne nivo od najmanje 10%. Vreme kašnjenja veoma često varira i teško se reprodukuje.

Vreme razgradnje nastupa nakon vremena kašnjenja i traje do momenta kada se dostigne 90% od maksimalnog nivoa razgradnje.

Desetodnevni period je period od 10 dana koji nastupa odmah pošto se dostigne nivo razgradnje od 10%.

*1.3. IZBOR ODGOVARAJUĆE METODE*

Za izbor najprikladnije metode, neophodni su podaci o rastvorljivosti, naponu pare i adsorpcionim svojstvima hemikalije. Treba poznavati hemijsku strukturu ili formulu da bi se izračunale teoretske vrednosti, odnosno proveriti izmerene vrednosti parametara, npr. ThOD, ThC.4-B, DOC, TOC i HPK (videti Deo drugi ove metode).

Hemikalije čija rastvorljivost nije niža od 100 mg/l mogu se ispitivati svim metodama ako nisu isparljive i ako se ne adsorbuju. Za one hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi, isparljive ili se adsorbuju, pogodne metode su naznačene u Tabeli 1. Mogući načini postupanja sa hemikalijama koje su slabo rastvorljive u vodi i koje su isparljive opisan je u Delu trećem ove metode. Srednje isparljive hemikalije mogu se ispitati pomoću metode Nestajanje DOC(Metoda C.4-A), ako u ispitivanim posudama (koje treba da budu adekvatno zapušene) ima dovoljno prostora za gas. U ovom slučaju, obavezno se postavlja abiotička kontrola kako bi se uzeo u obzir i bilo kakav fizički gubitak.

Tabela 1: Primenljivost metoda ispitivanja

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Metoda ispitivanja | Analitička metoda | Prikladnost za supstance: | | |
| koje su slabo rastvorljive | koje su  isparljive | koje se  adsorbuju |
| Nestajanje DOC (Metoda C.4-A) | Rastvoreni organski ugljenik | - | - | +/- |
| Modifikovana OECD trijaža - Nestajanje DOC (Metoda C.4-B) | Rastvoreni organski ugljenik | - | - | +/- |
| Razvijanje C.4-B (Metoda C.4-C) | Respirometrija: razvijanje C.4-B | + | - | + |
| Manometrijska respirometrija (Metoda C.4-D) | Man. respirometrija: potrošnja kiseonika | + | +/- | + |
| Ispitivanje u zatvorenoj boci (Metoda C.4-E) | Respirometrija: rastvoreni kiseonik | +/- | + | + |
| MITI ispitivanje  (Metoda C.4-F) | Respirometrija: potrošnja kiseonika | + | +/- | + |

Za tumačenje dobijenih rezultata neophodni su podaci o stepenu čistoće ili relativnom udelu glavnih sastojaka ispitivanog materijala, posebno kad su vrednosti rezultata niske ili granične.

Podaci o toksičnom dejstvu ispitivane hemikalije na bakterije (videti Deo četvrti ove metode) mogu biti vrlo korisni pri izboru prikladnih koncentracija za ispitivanje. Navedeni podaci mogu biti od suštinske važnosti za ispravno tumačenje niskih vrednosti biorazgradnje.

*1.4. REFERENTE SUPSTANCE*

Za proveru postupka ispituju se referentne hemikalije koje ispunjavaju kriterijume brze biorazgradljivosti i to tako što se uporedo sa ispitivanim postave i posude sa referentnom supstancom.

Podesne hemikalije su anilin (sveže destilovan), natrijum acetat i natrijum benzoat. Referentne hemikalije razgrađuju se primenom ovih metoda čak i kad namerno nije dodat nikakav inokulum.

Sugerisano je da treba tražiti referentnu hemikaliju koja je brzo biorazgradljiva, ali zahteva dodavanje inokuluma. Predložen je kalijum hidrogen-ftalat, ali je neophodno da se pribavi još dokaza za ovu supstancu pre nego što se ona prihvati kao referentna supstanca.

U respirometrijskim ispitivanjima, jedinjenja koji sadrže azot mogu uticati na potrošnju kiseonika usled nitrifikacije (videti Deo drugi i peti ove metode).

*1.5. PRINCIP METODE*

Rastvor ili suspenzija ispitivane supstance u mineralnoj podlozi inokuliše se i inkubira u aerobnim uslovima u mraku ili pod difuznim osvetljenjem. Količina DOC u ispitivanom rastvoru koja je poreklom iz inokuluma je što niža u poređenju sa količinom DOC iz ispitivane supstance. Računa se i na endogenu aktivnost inokuluma. Uporedo se postavlja slepa proba sa inokulumom, ali bez ispitivane supstance, iako se endogena aktivnost ćelija u prisustvu supstance ne poklapa sa onom u endogenoj kontroli. Uporedo se ispituje i referentna supstanca, kako bi se proverilo izvođenje samog postupka.

Nakon razgradnje sledi određivanje parametara poput DOC, produkcija C.4-B i potrošnja kiseonika, a merenja se sprovode u dovoljno čestim vremenskim intervalima kako bi se omogućilo utvrđivanje početka i kraja biorazgradnje. Merenje se sprovodi kontinuirano automatskim respirometrima. DOC se ponekad meri uporedo sa nekim drugim parametrom, i to na početku ili na kraju ispitivanja. Procena primarne razgradnje ispitivane supstance, kao i utvrđivanje koncentracija međuproizvoda koji mogu nastati, može se utvrditi pomoću specifične hemijske analize (obavezno u MITI ispitivanju).

Ispitivanje obično traje 28 dana. Ispitivanje se može završiti i pre isteka 28 dana, odnosno čim kriva biorazgradnje dostigne plato u najmanje tri određivanja. Ispitivanje se može produžiti posle 28 dana kada se po krivoj može videti da je biorazgradnja započeta, ali plato nije dostignut 28. dana.

*1.6. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.6.1. Ponovljivost**

Zbog prirode biorazgradnje i mešanih populacija bakterija koje se koriste kao inokulumi, ispitivanje se sprovodi najmanje u duplikatu.

Što je veća početna koncentracija mikroorganizama koja se prvobitno dodaje u ispitivanu podlogu, to je manje odstupanje između replika. Međulaboratorijska ispitivanja su pokazala da mogu postojati velika odstupanja među rezultatima dobijenih u različitim laboratorijama, mada se dobro slaganje obično postiže sa lako biorazgradljivim jedinjenjima.

**1.6.2. Prihvatljivost ispitivanja**

Ispitivanje se smatra validnim ukoliko na kraju ispitivanja ili na kraju 10-dnevnog perioda, zavisno od slučaja, razlika između krajnjih vrednosti, dobijenih pri dostizanju platoa razgradnje ispitivane supstance u ponovljenim ispitivanjima, iznosi manje od 20% i ako je procenat razgradnje referentne supstance dostigao nivo za brzu biorazgradljivosti od 14 dana.

Ako ni jedan od ovih uslova nije ispunjen, ispitivanje se ponavlja. Usled isključivosti metode, niske vrednosti nužno ne znače da ispitivana supstanca nije biorazgradljiva u uslovima životne sredine, ali ukazuju da je potrebno još rada da se ustanovi biorazgradljivost.

Ako se u ispitivanju toksičnosti, koje uključuje i ispitivanu supstancu i referentnu hemikaliju, desi manje od 35% razgradnje (na osnovu DOC) ili manje od 25% (na osnovu ThOD ili ThC.4-B) u roku od 14 dana, za ispitivanu hemikaliju se može pretpostaviti da je inhibitorna (videti Deo četvrti ove metode). Serije ispitivanja se ponavljaju, ako je moguće korišćenjem niže koncentracije ispitivane hemikalije, odnosno više koncentracije inokuluma, ali ne više od 30 mg/l čvrste faze.

*1.7. OPŠTE PROCEDURE I PREPARATI*

Opšti uslovi koji se primenjuju u ispitivanjima navedeni su u Tabeli 2. Oprema i drugi uslovi ispitivanja specifični za svaku pojedinu metodu ispitivanja navedeni su u kod opisa konkretne metode.

Tabela 2: Uslovi u toku ispitivanja

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Test | Nestajanje DOC | Razvijanje C.4-B | Manometrijska respirometrija | Modif. OECD skrining test | Ispitivanje u zatvorenoj boci | MITI Ispitivanje (I) |
| Koncentracija ispitivane supstance |  |  |  |  |  |  |
| kao mg/l |  |  | 100 |  | 2-10 | 100 |
| mg DOC/l | 10-40 | 10-20 |  | 10-40 |  |  |
| mg ThOD/l |  |  | 50-100 |  | 5-10 |  |
| Koncentracija inokuluma (u ćelijama/l, približno) | ≤ 30 mg/l SS ili ≤ 100 ml efluenta/l (107-108) | | | 0,5 ml sekund. efluenta/l (105) | ≤ 5 ml efluenta/l (104-106) | 30 mg/l SS (107-108) |
| Koncentracija elemenata u mineralnoj podlozi (mg/l) |  |  |  |  |  |  |
| P | 116 | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 122 | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05-0,1 | | | | 0,05-0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | najbolje 7,0 |
| Temperatura | 22°C ± 2°C | | | | | 25°C ± 1°C |
| SS - suspendovane čvrste materije | | | | | | |

**1.7.1. Voda za razblaživanje**

Koristi se dejonizovana ili destilovana voda, koja ne sadrži toksične supstance (npr. jone Cu2+) u inhibitornim koncentracijama. Voda ne sme sadržati više od 10% organskog ugljenika koji je unet sa ispitivanim materijalom. Visoka čistoća vode za razblaživanje neophodna je da se eliminišu visoke vrednosti u slepim probama. Kontaminacija može nastati zbog prirodno prisutnih nečistoća, kao i zbog smola jonskih izmenjivača i proizvoda razgradnje poreklom od bakterija i algi. U svakoj ispitivanoj seriji koristi se voda iz istog kontejnera, prethodno proverena pomoću DOC analize. Takva provera nije neophodna za ispitivanje u zatvorenoj boci, ali voda treba da ima malu potrošnju kiseonika.

**1.7.2. Osnovni rastvori mineralnih materija**

Da bi se pripremili ispitivani rastvori, pripremaju se osnovni rastvori mineralnih materija u odgovarajućim koncentracijama. Mogu se koristiti sledeći osnovni rastvori (sa različitim faktorima razblaženja) za metode: nestajanje DOC, modifikovani OECD skrining test, razvijanje C.4-B, manometrijska respirometrija ispitivanje u zatvorenoj boci.

Faktori razblaženja i priprema mineralne podloge specifična za MITI ispitivanje dati su u konkretnoj metodi ispitivanja.

Osnovni rastvori

Pomoću reagenasa analitičke čistoće pripremaju se osnovni rastvori:

1. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L (pH rastvora da bude 7,4):

- 8,50 g KH2PO4 (kalijum-dihidrogenfosfat);

- 21,75 gK2HPO4 (dikalijum-hidrogenfosfat);

- 33,40 gNa2HPO4´2H2O (dinatrijum-hidrogenfosfat dihidrat);

- 0,50 gNH4Cl (amonijum-hlorid);

2. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 27,50 g CaCl2 (kalcijum-hlorid, bezvodni) ili

- 36,40 g CaCl2´2H2O (kalcijum-hlorid dihidrat);

3. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 22,50 g MgSO4´7H2O (magnezijum-sulfat heptahidrat);

4. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 0,25 g FeCl3´6H2O (gvožđe(III)-hlorid heksahidrat).

Napomena: Za izbegavanje pripreme ovog rastvora neposredno pre upotrebe, dodaje se jedna kapljica koncentrovane HCl ili 0,4 g/l natrijumove soli EDTA (etilendiamintetra sirćetna kiselina).

**1.7.3. Osnovni rastvori hemikalija**

U zavisnosti od potrebe, rastvori se od 1 g do 10 g ispitivane ili referentne hemikalije u dejonizovanoj vodi i dopuni do 1 L nakon što rastvorljivost premaši vrednost 1 g/l. U suprotnom, osnovni rastvori se pripremaju u mineralnoj podlozi ili se hemikalija dodaje direktno u mineralnu podlogu. Za postupanje sa slabije rastvorljivim hemikalijama, videti Deo treći ove metode. U MITI ispitivanju (Metoda C.4-F) ne dozvoljava se upotreba rastvarača ni emulgatora.

**1.7.4. Inokulumi**

Inokulum može da potiče iz raznih izvora, kao što su: aktivni mulj, otpadna voda (dehlorisana), površinske vode i zemljište ili iz smeše ovih izvora. Ako se u ispitivanjima nestajanja DOC, razvijanja C.4-B i manometrijskoj respirometriji koristi aktivni mulj, mulj se uzima iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ili iz uređaja laboratorijskog tipa, koji prima pretežno otpadnu vodu iz domaćinstava. Pokazalo se da je rasipanje rezultata veće kad se koriste inokulumi iz drugih izvora. Za modifikovani OECD skrining test i ispitivanje u zatvorenoj boci, potreban je razređeniji inokulum bez folikula mulja, pa se uzima sekundarni efluent iz postrojenja za prečišćavanje komunalnih otpadnih voda ili uređaja laboratorijskog tipa. Za MITI ispitivanje, inokulum se izvodi iz mešanih izvora i dat je u konkretnoj metodi ispitivanja.

*1.7.4.1. Inokulum iz aktivnog mulja*

Svež uzorak aktivnog mulja uzima se iz aeracionog bazena postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ili uređaja laboratorijskog tipa u kojem se pretežno obrađuje komunalna otpadna voda. Veće grube čestice po potrebi se uklanjaju pomoću filtracije kroz fino sito, a mulj se nakon toga čuva u aerobnim uslovima.

Alternativno, nakon uklanjanja većih čestica, mulj se taloži ili centrifugira (npr. na 100 g u toku 10 minuta). Supernatant se baca. Mulj se može isprati u mineralnoj podlozi. Koncentrovani mulj se suspenduje u mineralnoj podlozi da se dobije koncentracija od 3 g do 5 g suspendovanih materija po litru i aeracija se sprovodi do upotrebe.

Mulj se uzima iz konvencionalnog uređaja koji ispravno radi. Mulj isprati ukoliko se uzima iz velikog uređaja za prečišćavanje ili se smatra da sadrži inhibitore. Nakon što se temeljno promeša, resuspendovani mulj se taloži ili centrifugira, supernatant se baca, a isprani mulj se ponovno resuspenduje u novoj zapremini mineralne podloge. Postupak se ponavlja sve dok se iz mulja ne odstrani višak supstrata ili inhibitora.

Nakon što se postigne potpuna resuspenzija ili sa neobrađenim muljem, uzima se uzorak neposredno pre određivanja suve mase suspendovanih materija.

Sledeća alternativa je homogenizacija aktivnog mulja (od 3 g/l do 5 g/l suspendovanih materija). Mulj se meša u mehaničkoj mešalici u toku 2 minuta umerenom brzinom. Promešani mulj se taloži 30 minuta ili duže, po potrebi, a tečni deo koji se koristi kao inokulum dekantuje se na 10 ml mineralne podloge.

*1.7.4.2. Ostali izvori inokuluma*

Inokulum može da se uzme iz sekundarnog efluenta iz postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijskog tipa koji prima uglavnom otpadne vode iz domaćinstava. Uzme se sveži uzorak i čuva u aerobnim uslovima u toku transporta. Uzorak se taloži u toku 1 sata ili filtrira kroz grubi filter papir, a efluent ili filtrat se dekantuje i čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Može se koristiti do 100 ml ove vrste inokuluma po litru podloge.

Izvor inokuluma mogu da budu i površinske vode. U tom slučaju uzima se uzorak odgovarajuće površinske vode, npr. iz reke ili jezera, i čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Po potrebi, inokulum se koncentriše filtriranjem ili centrifugiranjem.

**1.7.5. Prekondicioniranje inokuluma**

Inokulumi se mogu prekondicionirati za ispitivane uslove, ali se ne mogu preadaptirati za ispitivanu hemikaliju. Prekondicioniranje se sastoji od aeracije aktivnog mulja u mineralnoj podlozi ili sekundarnom efluentu u toku 5 do 7 dana na ispitivanoj temperaturi. Prekondicioniranje nekada poboljšava preciznost postupka ispitivanja, jer smanjuje vrednosti slepe probe. Smatra se da nije potrebno prekondicionirati MITI inokulum.

**1.7.6. Abiotička kontrola**

Po potrebi se proverava moguća abiotička razgradnja ispitivane supstance određivanjem uklanjanja DOC, potrošnje kiseonika i razvijanja ugljen-dioksida u sterilnim kontrolama koje ne sadrže inokulum. Sterilizacija se vrši filtracijom kroz membranu promera od 0,2 µm do 0,45 µm ili dodavanjem odgovarajuće toksične supstance u odgovarajućoj koncentraciji. Ako se koristi membranska filtracija, uzorci se uzimaju aseptički da se održi sterilnost. Testovi koji mere biorazgradnju kao uklanjanje DOC, posebno sa inokulumima aktivnog mulja, sadrže i abiotičku kontrolu, koja je inokulisana i otrovana, osim u slučaju kad se prethodno isključila adsorpcija ispitivane hemikalije.

**1.7.7. Broj posuda za ispitivanje**

Broj posuda u tipičnom načinu ispitivanja dat je u pojedinačnom ispitivanju.

Mogu se koristiti sledeće vrste posuda:

1) ispitivana suspenzija:

- sadrži ispitivanu supstancu i inokulum;

2) slepa proba sa inokulumom:

- sadrži samo inokulum;

3) kontrola postupka:

- sadrži referentnu supstancu i inokulum;

4) sterilna abiotička kontrola:

- sadrži ispitivanu supstancu (videti odeljak 1.7.6. ove metode);

5) kontrola adsorpcije:

- sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju;

6) kontrola toksičnosti:

- sadrži ispitivanu supstancu, referentnu supstancu i inokulum.

Određivanje u ispitivanoj suspenziji i slepoj probi sa inokulumom obavezno se rade uporedo. Savetuje se da se i određivanja u ostalim posudama rade uporedo.

Uporedo određivanje nekada nije moguće. Vodi se računa da se uzme dovoljno uzoraka i izvrši dovoljno merenja da se može proceniti procenat uklanjanja nakon desetodnevnog perioda.

*1.8. PODACI I PROCENA*

Kad se izračunava procenat razgradnje (Dt) koriste se srednje vrednosti dvostrukih merenja parametara u posudi za ispitivanje i slepoj probi sa inokulumom. Formule za izračunavanje date su u pojedinim metodama ispitivanja. Tok razgradnje prikazuje se grafički i pokazuje se desetodnevni period. Izračunava se i prikazuje procenat uklanjanja koji je postignut na kraju desetodnevnog perioda i vrednost na platou ili na kraju ispitivanja, u zavisnosti šta je primerenije.

U respirometrijskim ispitivanjima jedinjenja koja sadrže azot mogu uticati na potrošnju kiseonika zbog nitrifikacije (videti Deo drugi i Deo peti ove metode).

**1.8.1. Razgradnja merena pomoću određivanja DOC**

Procenat razgradnje (Dt) u trenutku uzimanja uzorka izračunava se posebno za svaku posudu koja sadrži ispitivanu supstancu pomoću srednjih vrednosti DOC iz dva merenja da bi se mogla proceniti prihvatljivost ispitivanja (videti odeljak 1.6.2. ove metode). Procenat razgradnje se izračunava prema jednačini:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dt = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x100 |
| Ct - Cbt |
| C0 - Cbo |

pri čemu:

Dt jeste procenat razgradnje u vremenu t;

C0 jeste srednja početna koncentracija DOC u inokulisanoj podlozi koja sadrži ispitivanu supstancu (u mg DOC/l);

Ct jeste srednja koncentracija DOC u inokulisanoj podlozi koja sadrži ispitivanu supstancu u vremenu t (u mg DOC/l);

Cb0 jeste srednja početna koncentracija DOC u mineralnoj podlozi inokulisanoj slepom probom (u mg DOC/l);

Cbt jeste srednja koncentracija DOC u mineralnoj podlozi inokulisanom slepom probom u vremenu t (u mg DOC/l).

Sve koncentracije mere se eksperimentalno.

**1.8.2. Razgradnja koja se meri pomoću specifične analize**

Primarna biorazgradnja, kad postoje podaci za specifičnu analizu, izračunava se prema formuli:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dt = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x100 |
| Sb - Sa |
| Sb |

pri čemu:

Dt jeste procenat razgradnje u vremenu t koje uobičajeno iznosi 28 dana;

Sa jeste ostatak ispitivane supstance u inokulisanoj podlozi na kraju ispitivanja (mg);

Sb jeste ostatak ispitivane supstance u slepoj probi sa vodom/podlogom kojoj je dodata samo ispitivana supstanca (mg).

**1.8.3. Abiotička razgradnja**

Procenat abiotičke razgradnje, kad se koristi abiotička sterilna kontrola, izračuna se pomoću formuli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %abiotičke razgradnje = | Cs(0) - Cs(t) | x 100 |
| Cs(0) |

pri čemu:

Cs(0) jeste DOC koncentracija u sterilnoj kontroli na dan 0;

Cs(t) jeste DOC koncentracija u sterilnoj kontroli na dan *t*.

*1.9. IZVEŠTAJ*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- ispitivanim i referentnim hemikalijama i njihovim čistoćama;

- uslovima u toku ispitivanja;

- inokulumu: priroda i mesto/mesta uzimanja uzorka, koncentracija i svaka obrada prekondicioniranjem;

- udelu i prirodi industrijskog otpada prisutnog u otpadnoj vodi (ako je poznato);

- dužini ispitivanja i temperaturi;

- u slučaju slabo rastvorljivih ispitivanih hemikalija, podatke o pripremi ukoliko je bilo,

- primenjenoj metodi ispitivanja (daju se naučni razlozi i objašnjenja za svaku izmenu u postupku);

- obrascu za unos podataka;

- svakoj primećenoj pojavi inhibicije;

- svakoj primećenoj abiotičkoj razgradnji;

- specifičnim hemijskim analizama, ako postoje;

- analitičkim podacima o međuproizvodima, ako postoje;

- grafičkim prikazima procenta razgradnje u vremenu za određenu ispitivanu i referentnu supstancu; faza odgode, faza razgradnje, desetodnevni period i nagib jasno se označavaju (videti odeljak 1.2. ove metode). Ako je ispitivanje zadovoljilo kriterijume prihvatljivosti, srednje vrednosti procenta razgradnje u posudama koje sadrže ispitivanu supstancu mogu se upotrebiti za izradu grafičkog prikaza;

- procentu uklanjanja nakon desetodnevnog perioda, kao i na platou ili na kraju ispitivanja.

**2. METODA ISPITIVANJA NESTAJANJE DOC   
(METODA C.4-A)**

*2.1. PRINCIP METODE*

Izmerena zapremina inokulisane mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane supstance (10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika aeriše se u mraku ili pod difuznim osvetljenjem na temperaturi od 22° C ± 2° C.

Nakon razgradnje sledi DOC analiza u čestim vremenskim intervalima u toku perioda od 28 dana. Stepen biorazgradnje izračunava se prikazivanjem koncentracije uklonjenog DOC (korigovan za onaj DOC u kontroli sa inokulisanom slepom probom) kao procenta od koncentracije prisutne na početku. Stepen primarne biorazgradnje može se izračunati i iz dopunske hemijske analize sprovedene na početku i na kraju inkubacije.

*2.2. OPIS METODE*

**2.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- erlenmajer sudove 250 ml do 2 L, u zavisnosti od zapremine potrebne za DOC analizu;

- mešalicu u koju se mogu pričvrstiti erlenmajer sudovi (sa ili bez automatske kontrole temperature ili se koriste pri konstantnoj sobnoj temperaturi), dovoljne snage da održi aerobne uslove u svim posudama;

- uređaj za filtriranje, sa odgovarajućim membranama;

- DOC analizator;

- uređaj za određivanje rastvorenog kiseonika;

- centrifugu.

**2.2.2. Priprema mineralne podloge**

Za pripremu osnovnog rastvora videti odeljak 1.8.2. ove metode.

Pomeša se 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnih rastvora 2. do 4. i dopuni se do 1 L vodom za razblaživanje.

**2.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može uzeti iz raznih vrsta izvora: aktivnog mulja, komunalnog efluenta, površinskih voda, zemljišta ili smeše istih.

Videti odeljke 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

**2.2.4. Priprema posuda za ispitivanje**

Ulije se 800 ml mineralne podloge u dvolitarske erlenmajer sudove i dodaju se dovoljne zapremine osnovnih rastvora ispitivanih i referentnih supstanci u odvojene sudove tako da se dobije koncentracija hemijskog ekvivalenta 10 mg DOC/ldo 40 mg DOC/l. Provere se pH vrednosti i dovedu, po potrebi, do 7,4. Aktivni mulj ili drugi izvori inokuluma (videti odeljak 1.7.4. ove metode) inokuliraju se u obične sudove tako da se dobije konačna koncentracija do najviše 30 mg/l suspendovanih materija. Pripreme se i kontrole inokuluma u mineralnoj podlozi, ali bez ispitivane ili referentne hemikalije.

Po potrebi, jedna posuda se koristi za proveru mogućeg inhibitornog efekta ispitivane hemikalije inokulacijom rastvora koji sadrži, u mineralnoj podlozi, slične koncentracije kako ispitivane, tako i referentne hemikalije.

Ako je potrebno postavi se još jedan sterilan običan sud da se pomoću neinokulisanog rastvora hemikalije proveri da li se hemikalija abiotički razgrađuje (videti odeljak 1.7.6. ove metode).

Ako se sumnja da se ispitivana hemikalija značajno adsorbuje na staklo, mulj, idr. napravi se preliminarna procena da se odredi verovatni opseg adsorpcije i tako pogodnost metode ispitivanja za date hemikalije (videti Tabelu 1). Postavi se običan sud koji sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

Zapremina u svim običnim sudovima se dopuni do 1 L mineralnom podlogom i nakon mešanja, uzima se uzorak iz svakog običnog suda da se odredi početna koncentracija DOC (videti odeljak 2.4. ove metode). Otvori običnih sudova se pokriju, npr. aluminijskom folijom, ali tako da se omogući slobodna razmena vazduha između običnog suda i okolne atmosfere. Zatim se posuda stavi na mešalicu da bi se započelo ispitivanje.

**2.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju**

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2;

- slepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;

- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6;

- kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;

- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Videti odeljak 1.7.7. ove metode.

**2.2.6. Postupak**

Tokom ispitivanja, koncentracije DOC u svakom običnom sudu određuju se u duplikatu u poznatim vremenskim intervalima, dovoljno često da se može odrediti početak desetodnevnog perioda i procenat uklanjanja na kraju desetodnevnog perioda. Uzima se samo minimalna zapremina ispitivane suspenzije potrebna za svako određivanje.

Pre uzimanja uzoraka gubitak nastao isparavanjem iz tikvica po potrebi se nadoknađuje dodavanjem vode za razblaživanje (videti odeljak 1.8.1. ove metode) u odgovarajućoj količini. Pre uzimanja uzorka, podloga za kulturu temeljno se promeša i osigura se da materijal koji prileže uz zidove posude bude rastvoren i suspendovan. Filtrira se kroz membrane ili centrifugira (videti odeljak 2.4. ove metode) odmah nakon uzimanja uzorka. Filtrirani ili centrifugirani uzorci analiziraju se istog dana; u suprotnom, čuvaju se najviše 48 sati na temperaturi od 2° C do 4° C ili na temperaturi ispod - 18° C u toku dužeg perioda.

*2.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**2.3.1. Obrada rezultata**

Izračuna se procenat razgradnje u vremenu t kako je opisano u odeljku 1.8.1. ove metode (određivanje DOC) i, po izboru, u odeljku 1.8.2. ove metode (specifična analiza).

Rezultati se zapisuju na obrascima za unos podataka.

**2.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Videti odeljak 1.6.2. ove metode.

**2.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

*2.4. OBRASCI ZA UNOS PODATAKA*

Primer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA NESTAJANJA DOC

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija

Početna koncentracija u podlozi, do/prema:... mg/l kao hemikalija

4. INOKULUM

Izvor:

Sprovedena obrada:

Prekondicioniranje, ako je sprovedeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smeši: … mg/l

5. ODREĐIVANJE UGLJENIKA

Analizator ugljenika:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Običan sud broj: |  | DOC nakon n dana (mg/l) | | | | |
| 0 | n1 | n2 | n3 | nx |
| Ispitivana supstanca plus inokulum | 1 | a1 |  |  |  |  |  |
| a2 |  |  |  |  |  |
| a, srednja Ca(t) |  |  |  |  |  |
| 2 | b1 |  |  |  |  |  |
| b2 |  |  |  |  |  |
| b, srednja Cb(t) |  |  |  |  |  |
| Slepa proba sa inokulumom bez ispitivane supstance | 3 | c1 |  |  |  |  |  |
| c2 |  |  |  |  |  |
| c, srednja C0(t) |  |  |  |  |  |
| 4 | d1 |  |  |  |  |  |
| d2 |  |  |  |  |  |
| d, srednja Cd(t) |  |  |  |  |  |
| |  |  | | --- | --- | | Cbl(t) = | Cc(0) - Cd(t) | | 2 | | |  |  |  |  |  |

6. PROCENA NEOBRAĐENIH PODATAKA

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Običan sud broj: |  | % razgradnje nakon n dana | | | | |
| 0 | n1 | n2 | n3 | nx |
| 1 | |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | Dl | = | 1 - | Ca(t) - Cbl(t) |  | x 100 | | Ca(0) - Cbl(0) | | 0 |  |  |  |  |
| 2 | |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | D2 | = | 1 -( | Ca(t) - Cbl(t) | ) | x 100 | | Ca(0) - Cbl(0) | | 0 |  |  |  |  |
| Srednja vrednost\* | |  |  |  | | --- | --- | --- | | D = | (D1 + D2) |  | | 2 |  | | 0 |  |  |  |  |
| \* Ne sme se koristiti srednja vrednost ako između D1 i D2 postoji značajna razlika | | | | | | |

Napomena: Za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti mogu se koristiti slični obrasci.

7. ABIOTIČKA KONTROLA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Vreme (u danima) | |
| 0 | t |
| DOC koncentracija (mg/l) u sterilnoj kontroli | Cs(0) | Cs(t) |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %abiotičke razgradnje = | Cs(0) - Cs(t) | x 100 |
| Cs(0) |

8. SPECIFIČNA HEMIJSKA ANALIZA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l) | % primarne razgradnje |
| Sterilna kontrola | Sb |  |
| Inokulisana ispitivana podloga | Sa |  |

**3. MODIFIKOVANI OECD SKRINING TEST   
(METODA C.4-B)**

*3.1. PRINCIP METODE*

Izmerena zapremina mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane supstance (10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika inokulira se sa 0,5 ml efluenta po litru medijuma. Smeša se aeriše u mraku ili pod difuznim osvetljenjem na 22° C ± 2° C.

Nakon razgradnje sledi DOC analiza u čestim razmacima u toku 28 dana. Stepen biorazgradnje izračunava se prikazivanjem koncentracije uklonjenog DOC (korigovanog za onaj u kontroli koju predstavlja inokulisana slepa proba) kao procenat od koncentracije prisutne na početku. Stepen primarne biorazgradnje može se izračunati iz dodatne hemijske analize koja se radi na početku i na kraju inkubacije.

*3.2. OPIS METODE*

**3.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- erlenmajer sudove zapremine od 250 ml do 2 L, u zavisnosti od zapremine potrebne za DOC analizu;

- mešalicu (u koju se mogu pričvrstiti erlenmajer sudovi sa automatskom kontrolom temperature ili bez, ako se koriste pri konstantnoj sobnoj temperaturi) dovoljne snage da održi aerobne uslove u svim posudama;

- uređaj za filtriranje, sa odgovarajućim membranama;

- DOC analizator;

- uređaj za određivanje rastvorenog kiseonika;

- centrifugu.

**3.2.2. Priprema mineralne podloge**

Za pripremu osnovnog rastvora, videti odeljak 1.7.2. ove metode.

Pomešati 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 80 ml vode za razblaživanje, dodati 1 ml osnovnog rastvora 2. do 4. i dopuniti vodom za razblaživanje do ukupne zapremine od 1 L.

U ovom postupku se koristi samo 0,5 ml/l efluenta kao inokulum, pa bi podlogu trebalo obogatiti elementima u tragovima i faktorima rasta. To se postiže dodatkom 1 ml svakog od sledećih rastvora po litru gotove podloge:

1. Rastvor elemenata u tragovima:

- 39,9 mg MnSO4´4H2O (mangan-sulfat tetrahidrat);

- 57,2 mg H3BO3 (borna kiselina);

- 42,8 mg ZnSO4´7H2O (cink-sulfat heptahidrat);

- 34,7 mg (NH4)6Mo7O24 (amonijum heptamolibdat);

- 100,0 mg FeCl3 i EDTA (helat gvožđa).

Rastvoriti u vodi za razblaživanje i dopuniti vodom do ukupno 1.000 ml.

2. Rastvor vitamina:

- ekstrakt kvasca 15,0 mg.

Rastvoriti ekstrakt kvasca u 100 ml vode. Sterilisati filtracijom kroz membranu od 0,2 µ ili pripremiti neposredno pred upotrebu.

**3.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma**

Inokulum se uzima iz sekundarnog efluenta iz postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijskog tipa koji prima pretežno otpadnu vodu iz domaćinstava. Videti odeljke 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

Koristi se 0,5 ml po litru mineralnog medijuma.

**3.2.4. Priprema običnih sudova**

Sipa se 800 ml mineralne podloge u dvolitarske erlenmajer sudove i doda se dovoljno velika zapremina osnovnih rastvora ispitivane i referentne supstance u odvojene obične sudove da se dobije koncentracija hemijskog ekvivalenta 10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l. Proveri se pH vrednost i po potrebi dovede na 7,4. Izlazni efluent inokuliše se u obične sudove u koncentraciji od 0,5 ml po litru (videti odeljak 1.7.4.2. ove metode). Pripreme se i kontrole inokuluma u mineralnoj podlozi, ali bez ispitivane ili referentne hemikalije.

Po potrebi, koristi se jedna posuda da se proveri mogući inhibitorni efekat ispitivane hemikalije inokulacijom rastvora koji sadrži, u mineralnoj podlozi, slične koncentracije i ispitivane i referentne hemikalije.

Ako je potrebno, postavi se još jedan sterilan običan sud da se pomoću neinokulisanog rastvora hemikalije proveri da li se ispitivana hemikalija razgrađuje abiotički (videti odeljak 1.8.6. ove metode).

Ako se sumnja da se ispitivana hemikalija značajno adsorbuje na staklo, mulj, itd. radi se preliminarna procena da se odredi verovatni opseg adsorpcije i time pogodnost metode za ispitivanje te hemikalije (videti Tabelu 1). Postavi se običan sud koji sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

U sve obične sudove dodaje se mineralna podloga do zapremine od 1 L. Nakon mešanja, uzima se uzorak iz svakog pojedinog običnog suda da se odredi početna koncentracija DOC (videti odeljak 2.4. ove metode). Pokriju se otvori običnih sudova, npr. sa aluminijskom folijom, ali tako da se omogući razmena vazduha između običnog suda i okolne atmosfere. Zatim se posude stavljaju na mešalicu i započinje se sa ispitivanjem.

**3.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju**

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2;

- slepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;

- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6;

- kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;

- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Videti odeljak 1.7.7. ove metode.

**3.2.6. Postupak**

Tokom čitavog ispitivanja, koncentracije DOC određuju se u svakom običnom sudu u duplikatu u poznatim vremenskim intervalima, dovoljno često da se može odrediti početak desetodnevnog perioda i procenat uklanjanja na kraju desetodnevnog perioda. Uzima se samo minimalna zapremina ispitivane suspenzije potrebne za svako određivanje.

Pre uzimanja uzoraka zapremina koja se izgubila isparavanjem iz tikvica nadoknađuje se po potrebi dodavanjem vode za razblaživanje (videti odeljak 1.7.1. ove metode) u odgovarajućoj količini. Pre uzimanja uzorka, podloga se temeljno promeša i pazi se da materijal koji prileže uz zidove posude bude rastvoren ili suspendovan. Odmah nakon uzimanja, uzorak se membranski filtrira ili centrifugira (videti odeljak 2.4. ove metode). Filtrirani ili centrifugirani uzorci analiziraju se istog dana; u suprotnom, čuvaju se na 2° C do 4° C u toku najviše 48 sati ili na temperaturi manjoj od - 18° C u toku dužeg perioda.

*3.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**3.3.1. Obrada rezultata**

Izračuna se procenat razgradnje u vremenu t kako je dato u odeljku 1.8.1. ove metode (DOC određivanje) i po izboru, u odeljku 1.8.2. ove metode (specifična analiza).

Rezultati se zapisuju na obrascima za unos podataka.

**3.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Videti odeljak 1.6.2. ove metode.

**3.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

*3.4. OBRASCI ZA UNOS PODATAKA*

Primer obrasca za unos podataka:

MODIFIKOVANAOECDTRIJAŽA

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija

Inicijalna koncentracija u podlozi, do:... mg/l kao hemikalija

4. INOKULUM

Izvor:

Obavljena obrada:

Prekondicioniranje, ako je obavljeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smeši: … mg/l

5. ODREĐIVANJE UGLJENIKA

Analizator ugljenika:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Običan sud broj: |  | DOC nakon n dana (mg/l) | | | | |
| 0 | n1 | n2 | n3 | nx |
| Ispitivana supstanca plus inokulum | 1 | a1 |  |  |  |  |  |
| a2 |  |  |  |  |  |
| a, srednja Ca(t) |  |  |  |  |  |
| 2 | b1 |  |  |  |  |  |
| b2 |  |  |  |  |  |
| b, srednja Cb(t) |  |  |  |  |  |
| Slepa proba sa inokulumom bez ispitivane supstance | 3 | c1 |  |  |  |  |  |
| c2 |  |  |  |  |  |
| c, srednja Cc(t) |  |  |  |  |  |
| 4 | d1 |  |  |  |  |  |
| d2 |  |  |  |  |  |
| d, srednja Cd(t) |  |  |  |  |  |
| |  |  | | --- | --- | | Cbl(t) = | Cc(0) - Cd(t) | | 2 | | |  |  |  |  |  |

6. PROCENA NEOBRAĐENIH PODATAKA

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Običan sud broj: |  | % razgradnje nakon n dana | | | | |
|  |  | 0 | n1 | n2 | n3 | nx |
| 1 | |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | Dl | = | 1 - | Ca(t) - Cbl(t) |  | x 100 | | Ca(0) - Cbl(0) | | 0 |  |  |  |  |
| 2 | |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | D2 | = | 1 - | Cb(t) - Cbl(t) |  | x 100 | | Cb(0) - Cbl(0) | | 0 |  |  |  |  |
| Srednja vrednost\* | |  |  |  | | --- | --- | --- | | D = | (D1 + D2) |  | | 2 |  | | 0 |  |  |  |  |
| \* Ne sme se koristiti srednja vrednost ako između D1 i D2 postoji značajna razlika | | | | | | |

Napomena: Za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti mogu se koristiti slični obrasci.

7. ABIOTIČKA KONTROLA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Vreme (u danima) | |
| 0 | t |
| DOC koncentracija (mg/l) u sterilnoj kontroli | Cs(0) | Cs(t) |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % abiotičke razgradnje = | Cs(0) - Cs(t) | x 100 |
| Cs(0) |

8. SPECIFIČNA HEMIJSKA ANALIZA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l) | % primarne razgradnje |
| Sterilna kontrola | Sb |  |
| Inokulisana ispitivana podloga | Sa |  |

**4. RAZVIJANJE METODE C.4-B (METODA C.4-C)**

*4.1. PRINCIP METODE*

Izmerena zapremina inokulisane mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane hemikalije (10 mg do 20 mg DOC ili TOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika aeriše se prolaskom vazduha bez ugljen-dioksida pri kontrolisanoj brzini u mraku ili pod difuznim osvetljenjem. Razgradnja se prati u toku 28 dana određivanjem proizvedenog ugljen-dioksida, koji se hvata barijum ili natrijum hidroksidom i meri titracijom rezidualnog hidroksida ili kao neorganski ugljenik. Količina ugljen-dioksida proizvedena iz ispitivane hemikalije (korigovano za onu količinu izvedenu iz slepe probe sa inokulumom) izražava se kao procenat ThC.4-B. Stepen biorazgradnje može se izračunati iz dodatne DOC analize koja se obavlja na početku i na kraju inkubacije.

*4.2. OPIS METODE*

**4.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- obične sudove, od 2 L do 5 L, svaki opremljen sa cevčicom za vazduh koja doseže skoro do dna posude i otvorom;

- magnetne mešalice, ako se ispituju slabo rastvorljive hemikalije;

- boce za apsorpciju gasova;

- uređaj za kontrolu i merenje protoka vazduha;

- opremu za uklanjanje ugljen-dioksida, tj. za pripremu vazduha koji ne sadrži ugljen-dioksid; alternativno se može koristiti smeša kiseonika bez C.4-B i azota bez C.4-B, iz gasnih cilindara, u pravoj proporciji (20% O2 : 80% N2);

- uređaj za određivanje ugljen-dioksida, ili titrimetrijski ili pomoću nekog tipa analizatora neorganskog ugljenika;

- uređaj za membransku filtraciju (nije obavezan);

- DOC analizator (nije obavezan).

**4.2.2. Priprema mineralne podloge**

Za pripremu osnovnog rastvora videti odeljak 1.8.2. ove metode.

Pomeša se 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnog rastvora 2. do 4. i dopuni vodom za razblaživanje do ukupno 1 L.

**4.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može uzeti iz raznih izvora: aktivnog mulja; efluenata otpadne vode; površinskih voda, zemljišta ili iz smeše istih.

Videti odeljke 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

**4.2.4. Priprema običnih sudova**

Kao primer, dole navedene zapremine i težine pokazuju vrednosti koje se koriste za petolitarske obične sudove koje sadrže 3 L suspenzije. Ako se koriste manje zapremine, vrednosti se prilagođavaju, s tim da se stvoreni ugljen-dioksid tačno meri.

U svaki petolitarski običan sud sipa se 2.400 ml mineralne podloge. Doda se odgovarajuća zapremina pripremljenog aktivnog mulja (videti odeljak 1.7.4.1. i 1.7.5. ove metode) tako da se u konačnoj inokulisanoj mešavini od 3 L dobije koncentracija suspendovanih materija od najviše 30 mg/l. Alternativno, prvo se može razrediti pripremljeni mulj da se formira suspenzija od 500 mg/l do 1.000 mg/l u mineralnoj podlozi pre dodavanja uzorka - tako da se dobije koncentracija od 30 mg/l. Postupak obezbeđuje veću preciznost. Mogu se koristiti i ostali izvori inokuluma (videti odeljak 1.7.4.2. ove metode).

Inokulirane smeše aerišu se vazduhom koji ne sadrži C.4-B u toku noći, da se sistem pročisti od ugljen-dioksida.

Ispitivani materijal i referentna supstanca dodaju se odvojeno, kao poznate zapremine osnovnih rastvora, u običnim sudovima u duplikatu, tako da finalne koncentracije, kojima su doprinele dodate hemikalije, budu od 10 mg do 20 mg DOC ili TOC/l. U neke obične sudove ne dodaju se hemikalije i one služe kao kontrola inokuluma. Slabo rastvorljive ispitivane supstance dodaju se direktno u obične sudove na bazi težine ili zapremine, kao što je opisano u Delu trećem ove metode.

Po potrebi, jedan običan sud se koristi za proveru mogućeg inhibitornog efekata ispitivane hemikalije tako što se dodaju i ispitivana i referentna hemikalija u istim koncentracijama u kojima su prisutne u drugim običnim sudovima.

Po potrebi, jedan sterilan običan sud koristi se kako bi se upotrebom neinokulisanog rastvora hemikalije proverilo da li se ispitivana hemikalija razgrađuje abiotički (videti odeljak 1.8.6. ove metode). Steriliše se dodavanjem toksične supstance u odgovarajućoj koncentraciji.

Suspenzija se u svim običnim sudovima dopuni do zapremine od 3 L dodavanjem mineralne podloge prethodno aerisane vazduhom koji ne sadrži C.4-B. Po izboru, mogu se izvući uzorci za analizu DOC (videti Deo drugi ove metode), odnosno uzorci za specifičnu analizu. Apsorpcione boce spajaju se sa otvorima za vazduh na običnim sudovima.

Ako se koristi barijum-hidroksid, spoje se tri apsorpcione boce, od kojih svaka sadrži 100 ml rastvora barijum-hidroksida od 0,0125 M, u seriji sa svakim petolitarskim običnim sudom. Navedeni rastvor ne sadrži istaloženi sulfat ni karbonat i njegova jačina se određuje neposredno pre upotrebe. Ako se koristi natrijum hidroksid, spajaju se dve klopke, od kojih druga ima ulogu kontrole, da se pokaže da se sav ugljen-dioksid apsorbovao u prvoj. Pogodne su apsorpcione boce sa gumenim čepom. U svaku bocu se doda po 200 ml 0,05 M natrijum-hidroksida, što je dovoljno da se apsorbuje ukupna količina ugljen-dioksida koja se razvije kad ispitivana hemikalija bude potpuno razgrađena. Rastvor natrijum-hidroksida, čak i kad je sveže pripremljen, sadrži tragove karbonata, što se koriguje oduzimanjem vrednosti karbonata u slepoj probi.

**4.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju**

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2;

- slepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;

- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6;

- kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;

- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Videti odeljak 1.7.7. ove metode.

**4.2.6. Postupak**

Ispitivanje započinje propuštanjem mehurića vazduha koji ne sadrži C.4-B kroz suspenzije brzinom od 30 ml/min do 100 ml/min. Periodično se uzimaju uzorci apsorbenta ugljen dioksida za analizu sadržaja C.4-B. Tokom prvih 10 dana preporučuje se da se analiza uradi svaki drugi ili treći dan, a zatim svaki peti dan sve do 28. dana, tako da se može identifikovati desetodnevni period.

Dvadesetosmog dana, uzimaju se uzorci (po izboru) za DOC, odnosno za specifičnu analizu, meri se pH suspenzije i dodaje 1 ml koncentrovane hlorovodične kiseline u svaki običan sud. Preko noći obični sudovi se aerišu da se izvuče ugljen-dioksid prisutan u ispitivanim suspenzijama. Dvadesetdevetog dana radi se poslednja analiza stvorenog ugljen-dioksida.

Na dane merenja C.4-B, odvaja se apsorber sa barijum hidroksidom koji je najbliži običnom sudu i hidroksidni rastvor se titrira sa 0,05 M HCl, pri čemu se fenolftalein koristi kao indikator. Preostali apsorberi se pomiču za jedno mesto bliže običnom sudu i postavlja se novi apsorber koji sadrži 100 ml svežeg 0,0125 M barijum hidroksida na najdalji kraj serije. Titracije se rade po potrebi, npr. kad se vidi velika precipitacija u prvoj klopci, a pre nego postane vidljiva u drugoj, ili najmanje jednom nedeljno. Alternativno se može, sa NaOH kao apsorbentom, pipetom izvući mali uzorak (u zavisnosti od karakteristika upotrebljenog analizatora ugljenika) rastvora natrijum hidroksida u apsorberu bližem običnom sudu. Uzorak se injektira direktno u IC deo analizatora ugljenika za analizu nastalog ugljen-dioksida.

Sadržaj druge klopke analizira se na kraju ispitivanja, radi korekcije za eventualni preneti ugljen-dioksid.

*4.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**4.3.1. Obrada rezultata**

Kad se istitrira, količina C.4-B uhvaćenog u apsorberu izražava se pomoću formule:

mgCO2 = (100 x CB - 0,5 x V x CA) x 44

pri čemu:

V jeste zapremina HCl upotrebljene za titraciju 100 ml u apsorberu (ml);

CB jeste koncentracija rastvora barijum hidroksida (M);

CA jeste koncentracija rastvora hlorovodične kiseline (M).

Ako CB iznosi 0,0125 M i CA iznosi 0,05 M, titracija za 100 ml barijum hidroksida jeste 50 ml, a masu C.4-B daje izraz:

|  |  |
| --- | --- |
| 0,05 | x 44 x ml titrirane HCL = 1,1 x ml HCL |
| 2 |

U ovom slučaju, za prevođenje zapremine istitrovane HCl u mg proizvedenog C.4-B primenjuje se faktor 1,1.

Izračunaju se mase C.4-B proizvedenog iz čistog inokuluma i inokuluma sa ispitivanom hemikalijom pomoću odgovarajućih titracijskih vrednosti, a dobijena razlika je masa C.4-B proizvedenog samo iz ispitivane hemikalije.

Na primer, ako sam inokulum daje titraciju od 48 ml, a inokulum sa ispitivanom hemikalijom daje 45 ml:

C.4-Biz inokuluma = 1,1 x (50 - 48) = 2,2 mg

C.4-Biz inokuluma sa ispitivanom hemikalijom = 1,1 x (50 - 45) = 5,5 mg

Masa C.4-B proizvedenog iz ispitivane hemikalije iznosi 3,3 mg.

Procenat biorazgradnje izračunava se formulom:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = | mg proizvedenog C.4 - B x 100 |  |
| ThC.4 - B x mg dodate ispitivane hemikalije |  |

ili formulom:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = | mg proizvedenog C.4 - B x 100 |  |
| mg TO dodatog prilikom ispitivanja x 3.67 |  |

uz 3,67 kao faktor konverzije (44/12) za ugljenik u ugljen-dioksid.

Da bi se dobio procenat razgradnje nakon bilo kog vremenskog intervala, doda se procenat vrednosti ThC.4-B izračunate za svaki pojedini dan, do vremena na koji se radilo merenje.

Za apsorbere od natrijum hidroksida, izračuna se količina proizvedenog ugljen-dioksida, izražena kao IC (mg), množenjem koncentracije IC u apsorbentu sa zapreminom apsorbenta.

Procenat razgradnje izračunava se formulom:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % ThC.4-B = | (mg IC običnog suda - mg IC slepe probe) |  |
| (MG TOC dodat kao ispitivana hemikalija) |  |

Uklanjanje DOC (po izboru) se izračuna na način iz odeljka 1.8. ove metode. Rezultati se zapisuju u obrascima za unos podataka.

**4.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Sadržaj IC u suspenziji ispitivane hemikalije u mineralnoj podlozi na početku ispitivanja iznosi manje od 5% TC, a ukupno razvijeni C.4-B u slepoj probi sa inokulumom na kraju ispitivanja ne sme normalno da premaši 40 mg/l podloge. Ako se dobiju vrednosti iznad 70 mg C.4-B/l, podaci i ispitivana tehnika se kritički ispituju.

Videti odeljak 1.6.2. ove metode.

**4.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

*4.4. OBRASCI ZA UNOS PODATAKA*

Primer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA RAZVIJANJA C.4-B

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija

Početna koncentracija u podlozi:... mg/l kao hemikalija

Ukupni C dodat u običnu posudu :... mg C

ThC.4-B: … mg C.4-B

4. INOKULUM

Izvor:

Sprovedena obrada:

Prekondicioniranje, ako je sprovedeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smeši:... mg/l

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vreme (dani) | Razvijeni C.4-B Test (mg) | | | Razvijeni C.4-B Slepa proba (mg) | | | Kumulativni razvijeni C.4-B (mg) (test minus srednja vrednost slepe probe) | | |  |  | | --- | --- | | ThC.4-b kumulativni CO2 | x 100 | | ThCO2 | | | |
|  | 1 | 2 | srednja vrednost | 3 | 4 | srednja vrednost | 1 | 2 | 1 | 2 | srednja vrednost |
| 0 |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| n1 |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| n2 |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| n3 |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 28 |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Napomena: Slični formati mogu se koristiti za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti.

6. ANALIZA UGLJENIKA (PO IZBORU)

Analizator ugljenika

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Vreme (u danima) | Slepa proba (mg/l) | Test hemikalija (mg/l) |
| 0 | Cb(0) | C0 |
| 28 (\*) | Cb(t) | Ct |
| (\*) ili na kraju inkubacije | | |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| % uključenog DOC = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x100 |
| Ct - Cbt |
| Ct - Cbt |

7. ABIOTIČKA RAZGRADNJA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % abiotičke razgradnje = | CO2 nastao u običnoj posudi nakon 28 dana mg | x 100 |
| ThCO2mg |

**5. MANOMETRIJSKA RESPIROMETRIJA (METODA C.4-D)**

*5.1. PRINCIP METODE*

Odmerena zapremina inokulisane mineralne podloge, koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane hemikalije (100 mg/l ispitivane supstance, da se dobije najmanje 50 mg ThOD/ldo 100 mg ThOD/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika, meša se u zatvorenom običnom sudu na stalnoj temperaturi (± 1° C ili manje) ne duže od 28 dana. Potrošnja kiseonika određuje se ili pomoću merenja količine kiseonika (proizvedenog elektrolizom) potrebnog da se održi konstantna zapremina gasa u običnom sudu respirometra ili iz promena u zapremini ili pritisku (ili kombinacijom ova dva načina) u opremi. Razvijeni ugljen-dioksid apsorbuje se u rastvoru kalijum hidroksida ili drugog pogodnog apsorbenta. Količina kiseonika koju potroši ispitivana hemikalija (korigovano za potrošnju inokuluma iz slepe probe, radi se uporedo) izražava se kao procenat ThOD ili HPK. Po izboru, primarna biorazgradnja može se izračunatii iz dodatne specifične analize urađene na početku i na kraju inkubacije, a krajnja biorazgradnja pomoću DOC analize.

*5.2. OPIS METODE*

**5.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- pogodni respirometar;

- kontrolu temperature, koja se održava unutar ± 1° C ili manje;

- sistem za membransku filtraciju (nije obavezan);

- analizator ugljenika (nije obavezan).

**5.2.2. Priprema mineralne podloge**

Za pripremu osnovnog rastvora, videti odeljak 1.7.2. ove metode.

Pomeša se 10 ml osnovnog rastvora 1 sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnog rastvora 2 do 4 i dopuni do zapremine od 1 L sa vodom za razblaživanje.

**5.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može uzeti iz raznih vrsta izvora: aktiviranog mulja, efluenta otpadnih voda, površinskih voda i zemljišta ili smeše istih.

Videti odeljke 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

**5.2.4. Priprema običnog suda**

Rastvori ispitivanih i referentnih hemikalija pripremaju se u odvojenim serijama, u mineralnoj podlozi ekvivalentno koncentraciji obično od 100 mg hemikalije/l (dajući najmanje 50 mg ThOD/ldo 100 mg ThOD/l), pomoću osnovnih rastvora.

ThOD se izračunava na osnovu nagrađenih soli amonijaka, osim u slučaju kad se očekuje nitrifikacija. Tada se izračunavanje bazira na stvaranju nitrata (videti odeljak 2.2. ove metode).

Odrede se pH vrednosti i po potrebi svedu na vrednosti od 7,4 ± 0,2.

Slabo rastvorljive supstance se dodaju u kasnijoj fazi.

Ako se određuje toksičnost ispitivane hemikalije, priprema se još jedan rastvor u mineralnoj podlozi koja sadrži i ispitivanu i referentnu hemikaliju u istim koncentracijama kao i pojedinačni rastvori.

Ako se meri fizičko-hemijska potrošnja kiseonika, priprema se rastvor ispitivane hemikalije u koncentraciji obično od 100 mg ThOD/l koja je prethodno bila sterilisana dodatkom odgovarajuće toksične supstance (videti odeljak 1.7.6. ove metode).

Potrebna zapremina svakog od rastvora ispitivane i referentne hemikalije sipa se u najmanje dva obična suda. U ostale obične sudove dodaje se samo mineralna podloga (za kontrolu inokuluma) i po potrebi, pomešani rastvori ispitivane/referentne supstance i sterilni rastvor.

Ako je ispitivana supstanca slabo rastvorljiva, u ovoj fazi se ona dodaje direktno na osnovu mase ili zapremine, ili se obrađuje na način iz odeljka 3. ove metode. U odeljke C.4-B apsorbera dodaju se kalijum-hidroksid, zrnca natrijum i kalcijum-hidroksida (kreč) ili drugi apsorbensi.

**5.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju**

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2;

- slepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;

- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna kontrola: običan sud broj 6;

- kontrola toksičnosti: običan sud broj 7.

Videti odeljak 1.7.7. ove metode.

**5.2.6. Postupak**

Nakon što se u posudama postigne željena temperatura, u odgovarajuće posude se inokuliše pripremljeni aktivni mulj ili inokulum iz drugog izvora da se dobije koncentracija suspendovanih materija ne veća od 30 mg/l. Sastavi se oprema, pokrene mešalica, proveri se izolacija vazduha i započne sa merenjem potrošnje kiseonika. Obično nije potreban dodatni oprez osim što se rade obavezna očitavanja i svakodnevno proverava da je temperatura tačna i da mešalica radi.

Potrošnja kiseonika izračunava se iz očitavanja obavljenih u redovnim i čestim intervalima, pomoću postupaka koje je dao proizvođač opreme. Na kraju inkubacije, obično od 28 dana, izmeri se pH vrednost sadržaja običnih sudova, posebno ako je potrošnja kiseonika niska ili veća od ThODNH4 (za jedinjenja koja sadrže azot).

Po potrebi se uzimaju uzorci iz respirometrijskih običnih sudova, na početku i na kraju, za analizu DOC ili specifične hemikalije (videti odeljak 2.4. ove metode). Kad se prvi put uzimaju uzorci, potrebno je znati zapreminu test suspenzije koja je preostala u običnom sudu. Kad test supstanca koja sadrži azot troši kiseonik, određuje se porast koncentracije nitrita ili nitrata u toku 28 dana i izračuna se korekcija za kiseonik potrošen u nitrifikaciji (videti Deo peti ove metode).

*5.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**5.3.1. Obrada rezultata**

Kiseonik (mg) koji je potrošila ispitivana hemikalija u određenom vremenskom periodu (korigovan za onaj pomoću kontrole slepe probe sa inokulumom u istom vremenskom periodu) podeli se sa masom upotrebljene ispitivane hemikalije. Time se dobije BPK izražen kao mg kiseonika po mg ispitivane hemikalije, to jest:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| BPK = | mg potrošnja O2 ispitivane hemikalije - mg potrošnja O2 slepe probe |  |
| mg ispitivane hemikalije u običnom sudu |  |
|  | = mg O2 po mg ispitivane hemikalije |  |

Procenat biorazgradnje izračunava se pomoću jednačine:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = ThOD = | BPK (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) | x 100 |
| ThOD (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) |

ili jednačine:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % HPK = | BPK(mg O2 / mg ispitivane hemikalije) | x 100 |
| HPK(mg O2 / ispitivane hemikalije) |

Ova dva postupka ne daju obavezno iste vrednosti. Prednost se daje prvom postupku.

Za ispitivanje supstanci koje sadrže azot, koristi se odgovarajući ThOD (NH4 ili NO3) u zavisnosti od toga šta se zna ili šta se očekuje u vezi sa pojavom nitrifikacije (videti odeljak 2.2. ove metode). Ako nastupi nitrifikacija, ali ne bude potpuna, izračuna se korekcija za kiseonik potrošen u nitrifikaciji iz promena u koncentraciji nitrita i nitrata (videti Deo peti ove metode).

Kad se rade opciona određivanja organskog ugljenika, odnosno specifične hemikalije, procenat razgradnje se izračunava na način iz odeljka 1.8. ove metode.

Rezultati se zapisuju u obrasce za unos podataka.

**5.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Potrošnja kiseonika slepe probe sa inokulumom normalno iznosi 20 mg/lO2 do 30 mg/l O2 i ne sme biti veća od 60 mg/l u 28 dana. Ako su vrednosti veće od 60 mg/l, kritički proveriti podatke i ispitivane tehnike. Ako pH vrednost izlazi izvan opsega od 6 do 8,5 i potrošnja kiseonika ispitivane hemikalije je manja od 60% kiseonika, ispitivanje se ponavlja sa nižim koncentracijama ispitivane hemikalije.

Videti odeljak 1.6.2. ove metode.

**5.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

*5.4. OBRASCI ZA UNOS PODATAKA*

Primer obrasca za unos podataka:

MANOMETRIJSKA RESPIROMETRIJA

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l

Početna koncentracija u podlozi, Co :... mg/l

Zapremina u običnom sudu (V):... ml

ThOD ili HPK:... mg O2/... mg ispitivane supstance (NH4 ili NO3)

4. INOKULUM

Izvor:

Sprovedena obrada:

Prekondicioniranje, ako je obavljeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smesi:... mg/l

5. POTROŠNJA KISEONIKA: BIORAZGRADLJIVOST

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vreme (u danima) | | Vreme (u danima) | | | | | | | | | | | |
| 0 |  | 7 |  | 14 |  |  | 21 |  |  | 28 |  |
| Potrošnja O2 (mg) ispitivana hemikalija | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| a, srednja vrednost |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Potrošnja O2 (mg) Slepa proba | 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| b, srednja vrednost |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Korigovani BPK | (a1 - bna) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| (a2 - bna) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| BPK po mg test hemikalije | |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | |  | |  | | --- | | (a1 - b) | | C0V | |  | | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | |  | |  | | --- | | (a2 - b) | | C0V | |  | | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| % razgradnje   |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | |  | |  |  | | --- | --- | | PBK | x100 | | ThOD | |  | | | D1(a1) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D2(a2) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| srednja vrednost (\*) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| V - zapremina podloge u običnom sudu | | | | | | | | | | | | | |
| (\*) Ne sme se računati srednja vrednost ako postoji velika razlika između D1 i D2 | | | | | | | | | | | | | |

Napomena: Slični obrasci mogu se koristiti za referentnu hemikaliju i kontrolu toksičnosti.

6. KOREKCIJA ZBOG NITRIFIKACIJE (videti Deo peti ove metode)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Dan | | 0 | 28 | razlika |
| (I) | Koncentracija nitrata (mg N/L) |  |  | (N) |
| (II) | Ekvivalent kiseonika (4,57 × N × V) (mg) | - | - |  |
| (III) | Koncentracija nitrita (mg N/L) |  |  | (N) |
| (IV) | Ekvivalent kiseonika (3,43 × N × V) (mg) | - | - |  |
| (II+IV) | Ukupni ekvivalent kiseonika | - | - |  |

7. ANALIZA UGLJENIKA (po izboru)

Analizator ugljenika:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Vreme (u danima) | Slepa proba (mg/l) | Test hemikalija (mg/l) |
| 0 | Cbl0 | C0 |
| 28 (\*) | Cblt | Ct |
| (\*) Ili na kraju inkubacije | | |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| % uključenog DOC = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x 100 |
| Ct - Cblt |
| C0 - Cblt |

8. SPECIFIČNA HEMIKALIJA (po izboru)

Sb = koncentracija u fizičko-hemijskoj (sterilnoj) kontroli 28. dana

Sa = koncentracija u inokulisanom običnom sudu 28. dana

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % biorazgradnje = | Sb - Sa | x100 |
| Sb |

Pri čemu:

Sb jeste koncentracija u fizičko-hemijskoj (sterilnoj) kontroli 28. dana;

Sa jeste koncentracija u inokulisanom običnom sudu 28. dana

9. ABIOTIČKA RAZGRADNJA (po izboru)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| potrošnja O2 po mg ispitivane hemikalije = | a x 100 |  |
| C0V |  |

(videti odeljak 1. i 3. ove metode)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % abiotičke razgradnje = | a x 100 |  |
| C0V x ThOD |  |

Pri čemu a jeste potrošnja kiseonika u sterilnom običnom sudu nakon 28 dana, (mg).

**6. METODA ISPITIVANJA U ZATVORENOJ BOCI (METODA C.4-E)**

*6.1. PRINCIP METODE*

Rastvor ispitivane hemikalije u mineralnoj podlozi, obično 2 mg/l do 5 mg/l, inokuliše se sa relativno malim brojem mikroorganizama iz mešane populacije i čuva u potpuno punim, zatvorenim bocama u mraku na stalnoj temperaturi. Nakon razgradnje sledi analiza rastvorenog kiseonika u toku 28 dana. Količina kiseonika koju veže ispitivana hemikalija, korigiovana za kiseonik koji je potrošila uporedna slepa proba sa inokulumom, izražava se kao procenat ThOD ili HPK.

*6.2. OPIS METODE*

**6.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- BPK boce sa staklenim zatvaračima, npr. 250 ml do 300 ml;

- vodeno kupatilo ili inkubator, za čuvanje boca na stalnoj temperaturi (± 1° C ili manje) bez svetla;

- velike staklene boce (od 2 L do 5 L) za pripremu podloge i za punjenje BPK boca;

- kiseoničnu elektrodu i merni instrument ili opremu i reagense za Vinklerovu titraciju (Winkler titration).

**6.2.2. Priprema mineralne podloge**

Za pripremu osnovnog rastvora, videti odeljak 1.7.2. ove metode.

Pomeša se 1 (jedan) ml osnovnog rastvora 1 do 4 i dopuni do zapremine od 1 L sa vodom za razblaživanje.

**6.2.3. Priprema inokuluma**

Inokulum se normalno dobija iz sekundarnih otpadnih voda postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijskog tipa koji prima uglavnom otpadnu vodu iz domaćinstava. Alternativni izvor inokuluma su površinske vode. Obično se koristi jedna kapljica (od 0,05 ml do 5,0 ml filtrata po litru podloge). Da bi se pronašla optimalna zapremina za određenu otpadnu vodu, ponekad će biti potrebno više pokušaja (videti odeljke 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode).

**6.2.4. Priprema običnih sudova**

Mineralna podloga se temeljno aeriše u toku najmanje 20 minuta. Svaka ispitivana serija postavlja se sa mineralnom podlogom dobijenom iz iste serije. Podloga je spremna za upotrebu nakon što odstoji 20 sati, na ispitivanoj temperaturi. Odredi se koncentracija rastvorenog kiseonika zbog kontrole. Vrednost koncentracije iznosi oko 9 mg/l na 20° C. Prilikom prenosa i punjenja podloge zasićene vazduhom ne smeju se stvoriti mehurići, što se postiže pomoću sifona.

Pripreme se paralelno grupe BPK boca za određivanje ispitivane i referentne hemikalije u uporednim serijama. Prikupi se dovoljan broj BPK boca, uključujući slepe probe sa inokulumom, da se potrošnja kiseonika može meriti najmanje u duplikatu u željenim intervalima, npr. nakon 0, 7, 14, 21 i 28 dana. Da bi se identifikovao desetodnevni period, može biti potrebno više boca.

Velike boce se pune potpuno aerisanom mineralnom podlogom do jedne trećine zapremine. Zatim se sipa dovoljno osnovnog rastvora ispitivane hemikalije i referentne hemikalije u odvojene velike boce, tako da konačna koncentracija hemikalije ne bude veća od 10 mg/l. U podlogu sa slepom probom kao kontrolnom u narednoj velikoj boci ne dodaju se nikakve hemikalije.

Da bi se osiguralo da aktivnost inokuluma ne bude ograničena, koncentracija rastvorenog kiseonika ne sme pasti ispod 0,5 mg/l u BPK bocama. Ovo ograničava koncentraciju ispitivane hemikalije na oko 2 mg/l. Za slabo razgradljiva jedinjenja i ona sa niskim ThOD, može se upotrebiti 5 mg/l do 10 mg/l. U nekim slučajevima, preporučljivo je postaviti uporedne serije ispitivane hemikalije u dve različite koncentracije, npr. od 2 mg/l do 5 mg/l. ThOD se računa na osnovu nagrađenih amonijevih soli, ali ako se očekuje ili se zna da postoji nitrifikacija, izračunava se na osnovu stvorenih nitrata (ThODNO3: videti odeljak 2.2. ove metode). Ako nitrifikacija nije potpuna, iako postoji, radi se korekcija za promene u koncentraciji nitrita i nitrata, određena analizom (videti Deo peti ove metode).

Ako se određuje toksičnost ispitivane hemikalije (u slučaju, npr. da je prethodno utvrđena niska vrednost biorazgradljivosti), potreban je još jedan niz boca.

Pripremi se još jedna velika boca i napuni aerisanom mineralnom podlogom (do otprilike jedne trećine zapremine boce) pa se u bocu dodaju ispitivana i referentna hemikalija u konačnim koncentracijama koje su iste kao i koncentracije u drugim velikim bocama.

Ovi rastvori se inokulišu u velike boce koje sadrže sekundarni efluent (jedna kapljica ili 0,05 ml/l do 5,0 ml/l) ili drugi izvor, kao što je rečna voda (videti odeljak 1.7.4.2. ove metode). Na kraju se pripremaju rastvori sa aerisanom mineralnom podlogom pomoću gumene cevi koja doseže do dna boce, da bi se postiglo odgovarajuće mešanje podloge i rastvora.

**6.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju**

U tipičnom ispitivanju koristi se:

- najmanje 10 boca koje sadrže ispitivanu hemikaliju i inokulum (ispitivana suspenzija);

- najmanje 10 boca koje sadrže samo inokulum (slepa proba sa inokulumom);

- najmanje 10 boca koje sadrže referentnu hemikaliju i inokulum (kontrola postupka);

- i, po potrebi, 6 boca koje sadrže ispitivanu hemikaliju, referentnu hemikaliju i inokulum (kontrola toksičnosti). Da bi se desetodnevni period mogao sa sigurnošću identifikovati, potrebno je najmanje dvostruko više boca.

**6.2.6. Postupak**

Pojedinačni pripremljeni rastvori iz donje četvrtine (ne sa dna) odgovarajuće velike boce odmah se raspodele pomoću cevi u odgovarajući niz BPK boca, tako da sve BPK boce budu potpuno pune. Nežnim kuckanjem po zidu boce uklone se mogući mehurići vazduha. Odmah se u nultom vremenu radi analiza rastvorenog kiseonika u BPK bocama pomoću Vinklerove metode ili elektroda. Sadržaj boca može se sačuvati za kasniju analizu Vinklerovom metodom dodavanjem mangan(II)-sulfata i natrijum-hidroksida (prvi Vinklerov reagens). Boce se čuvaju dobro zatvorene, jer je prisutan kiseonik fiksiran u obliku smeđeg mangan(III)-hidroksida, u mraku na temperaturi od 10° C do 20° C ne duže od 24 sata pre nastavka sa preostalim koracima Vinklerove metode. Zatvaračem se zatvore preostali duplikati boca (pazi se da u bocama ne ostanu mehurići vazduha) i inkubiraju se na 20° C u mraku. Uz svaku seriju postoji potpuno uporedna serija za određivanje podloge inokulirane slepom probom. Za potrebe analize uzimaju se najmanje po dve boce iz iste serije zbog analize rastvorenog kiseonika u određenim vremenskim intervalima (najmanje jedanput nedeljno) u toku 28 dana inkubacije.

Nedeljni uzorci treba da omoguće predviđanje procenta uklanjanja u razdoblju od 14 dana. Uzimanje uzoraka svaka 3 do 4 dana treba da omogući identifikaciju razdoblja od 10 dana, za što je potrebno dvostruko više boca.

Za ispitivane supstance koje sadrže azot, prave se korekcije za potrošnju kiseonika zbog moguće nitrifikacije. Prvo se koristi metoda O2-elektrode da bi se odredila koncentracija rastvorenog kiseonika, a zatim se izvlači uzorak iz BPK boce za analizu na nitrate i nitrite. Iz povećanja u koncentraciji nitrata i nitrita, izračuna se potrošeni kiseonik (videti Deo peti ove metode).

*6.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**6.3.1. Obrada rezultata**

Prvo se izračuna BPK nakon svakog vremenskog intervala tako što se oduzme vrednost pada kiseonika (mg O2/l) iz slepe probe sa inokulumom od one koju je pokazala ispitivana hemikalija. Korigovani pad kiseonika podeli se sa koncentracijom (mg/l) ispitivane hemikalije, da se dobije specifični BPK kao mg kiseonika po mg ispitivane hemikalije. Izračuna se procenat biološke razgradljivosti deljenjem specifičnog BPK sa specifičnim ThOD (izračunati u skladu sa odeljkom 2.2. ove metode) ili HPK (određeno analizom, videti odeljak 2.3. ove metode), pa je:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| BPK = | mg potrošnja O2 ispitivane hemikalije - mg potrošnja O2 slepe probe |  |
| mg ispitivane hemikalije u običnom sudu |  |
|  | = mg O2 po mg ispitivane hemikalije |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = | BPK (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) | x 100 |
| ThOD (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) |

ili:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = | BPK (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) | x 100 |
| HPK (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) |

Ova dva postupka ne daju obavezno iste vrednosti. Prednost se daje prvom postupku.

Za ispitivane supstance koje sadrže azot, koristi se odgovarajući ThOD (NH4 ili NO3) prema onome što se zna ili očekuje u pogledu pojave nitrifikacije (videti odeljak 2.2. ove metode). Ako je nitrifikacija prisutna, ali nije potpuna, izračuna se korekcija za kiseonik potrošen nitrifikacijom iz promena u koncentraciji nitrita i nitrata (videti Deo peti ove metode).

**6.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Pad kiseonika u slepoj probi sa inokulumom ne sme da bude viši od 1,5 mg rastvorenog kiseonika po litru nakon 28 dana. Vrednosti veće od ove zahtevaju proveru eksperimentalnih tehnika. Rezidualna koncentracija kiseonika u ispitivanim bocama ne sme da se spusti na vrednosti niže od 0,5 mg/l ni u jednom trenutku. Tako niski nivoi kiseonika prihvatljivi su samo ako se postupkom koji se koristi za određivanje rastvorenog kiseonika mogu tačno meriti takve koncentracije.

Videti odeljak 1.6.2. ove metode.

**6.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

*6.4. OBRAZAC ZA UNOS PODATAKA*

Primer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA U ZATVORENOJ BOCI

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l

Početna koncentracija u boci:... mg/l

ThOD ili HPK:... mg O2 /... mg ispitivane supstance

4. INOKULUM

Izvor:

Obavljena obrada:

Prekondicioniranje, ako ga je bilo:

Koncentracija u reakcionoj smesi:... mg/l

5. ODREĐIVANJE DO

Postupak: Vinkler/elektroda

Analize običnih sudova

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vreme inkubacije (u danima) | | | DO (mg/l) | | | |
| 0 | n1 | n2 |  |
| Slepa proba (bez hemikalija) | 1 | C1 |  |  |  |  |
| 2 | C2 |  |  |  |  |
| Srednja vrednost | |  |  | | --- | --- | | mb = | C1+C2 | | 2 | |  |  |  |  |  |
| Ispitivanja hemikalija | 1 | a1 |  |  |  |  |
| 2 | a2 |  |  |  |  |
| Srednja vrednost | |  |  | | --- | --- | | m1 = | a1+a2 | | 2 | |  |  |  |  |  |

Napomena: Sličan obrazac može se koristiti za referentno jedinjenje i kontrolu toksičnosti.

6. KOREKCIJA ZBOG NITRIFIKACIJE (videti Deo peti ove metode)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vreme inkubacije (u danima) | | 0 | n1 | n2 | n3 |
| (I) | Koncentracija nitrata (mg N/l) |  |  |  |  |
| (II) | Promena u koncentraciji nitrata (mg N/l) | - |  |  |  |
| (III) | Ekvivalent kiseonika (mg/l) | - |  |  |  |
| (IV) | Koncentracija nitrita (mg N/l) |  |  |  |  |
| (V) | Promena u koncentraciji nitrita (mg N/l) | - |  |  |  |
| (VI) | Ekvivalent kiseonika (mg/l) | - |  |  |  |
| (III+VI) | Ukupni ekvivalent kiseonika (mg/l) | - |  |  |  |

7. PAD KONCENTRACIJE RASTVORENOG KISEONIKA (DO): PROCENAT RAZGRADNJE

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Pad nakon n dana (mg/l) | | | |
| n1 | n2 | n3 |  |
| OBIČAN SUD 1: (mt0 - mtx) - (mb0 - mbx) |  |  |  |  |
| OBIČAN SUD 2: (mt0 - mtx) - (mb0 - mbx) |  |  |  |  |
| OBIČAN SUD 1:   |  |  | | --- | --- | | % D1 = | (mt0 - mtx) - (mb0 - mbx)x100 | | konc. ispit. x ThOD hemikalije | |  |  |  |  |
| OBIČAN SUD 2:   |  |  | | --- | --- | | % D2 = | (mt0 - mtx) - (mb0 - mbx)x100 | | konc. ispit. x ThOD hemikalije | |  |  |  |  |
| |  |  |  | | --- | --- | --- | | srednja vrednost % D\* = | D1 + D2 |  | | 2 | |  |  |  |  |
| (\*) Srednja vrednost se ne koristi ako su postojale velike razlike između dva merenja. | | | | |

Pri čemu:

mt0 jeste vrednost u običnom sudu u vremenu 0;

mtx jeste vrednost u običnom sudu u vremenu x;

mb0 jeste srednja vrednost slepe probe u vremenu 0;

mbx jeste srednja vrednost slepe probe u vremenu x.

Primenjuje se korekcija zbog nitrifikacije u tački 6 (III + VI).

8. PAD KONCENTRACIJE RASTVORENOG KISEONIKA (DO) SLEPE PROBE

Potrošnja kiseonika slepe probe: (mbo - mb28) mg/l. Ova potrošnja je važna za prihvatljivost ispitivanja i niža je od 1,5 mg/l.

**7. MITI ISPITIVANJE (METODA C.4-F)**

*7.1. PRINCIP METODE*

Kiseonik koji potroše mešani rastvor ili suspenzija, ispitivana hemikalija u mineralnoj podlozi, inokulisana sa specijalno uzgojenim, neprilagođenim mikroorganizmima, meri se automatski u toku 28 dana u zamračenom zatvorenom respirometru na temperaturi od 25° C ± 1° C. Ugljen-dioksid koji se razvije apsorbuje kreč. Biorazgradljivost se izražava kao procenat potrošnje kiseonika (korigovan za potrošnju kiseonika slepe probe) teoretske potrošnje (u daljem tekstu: ThOD). Procenat primarne biološke razgradljivosti izračunava seiz dodatne specifične hemijske analize urađene na početku i kraju inkubacije i opciono, DOC analizom.

*7.2. OPIS METODE*

**7.2.1. Oprema**

Oprema za ispitivanje sadrži:

- automatski elektrolitski BPK merač ili respirometar obično opremljen sa 6 boca, svaka zapremine od 300 ml i sa posudicama koje sadrže apsorbent za ugljen-dioksid;

- stalnu sobnu temperaturu, odnosno vodeno kupatilo temperature 25° C ± 1° C ili manje;

- sistem za membransku filtraciju (nije obavezan);

- uređaj za analizu ugljenika (nije obavezan).

**7.2.2. Priprema mineralne podloge**

Pripreme se sledeći osnovni rastvori, pomoću analitičkih reagenasa i vode (videti odeljak 1.7.1. ove metode):

1. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L (pH rastvora je potrebno da bude 7,2):

- 8,50 g KH2PO4 (kalijum-dihidrogenfosfat);

- 21,75 gK2HPO4 (dikalijum-hidrogenfosfat);

- 44,60 g Na2HPO4´12H2O (dinatrijum-hidrogenfosfat dodekahidrat);

- 1,70 g NH4Cl (amonijum-hlorid);

2. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 22,50 g MgSO4´7H2O (magnezijum-sulfat heptahidrat);

3. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 27,50 g CaCl2 (kalcijum-hlorid, bezvodni);

4. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:

- 0,25 g FeCl3´6H2O (gvožđe(III)-hlorid heksahidrat).

Uzme se 3 ml osnovnog rastvora 1, 2, 3. i 4. i dopuni do 1 L.

**7.2.3. Priprema inokuluma**

Uzmu se sveži uzorci iz najmanje 10 različitih mesta, uglavnom u područjima u kojima se koriste i u koja se ispuštaju razne hemikalije. Sa lokacija, kao što su postrojenja za prečišćavanje otpadne vode iz domaćinstava, za obradu industrijske otpadnih voda, reka, jezera, mora, prikupi se 11 uzoraka mulja, površinskog zemljišta, vode, itd. i sve zajedno temeljno se promeša. Nakon uklanjanja plutajućih materija i nakon sleganja, supernatant se svede na pH (7 ± 1) pomoću natrijum hidroksida i fosforne kiseline.

Koristi se odgovarajuća zapremina filtriranog supernatanta da se napuni posuda za punjenje i izvlačenje aktivnog mulja, a tečnost se aeriše u toku otprilike 23 1/2 sata. Trideset minuta nakon aeracije, baci se oko jedne trećine ukupne zapremine supernatanta i istaloženom materijalu doda jednaka zapremina rastvora (pH 7) koji sadrži 0,1% glukoze, peptona i kalijum ortofosfata i ponovo aeriše. Ovaj postupak se ponavlja jedanput dnevno. Jedinicom za mulj upravlja se u skladu sa dobrom praksom: otpadna voda je bistra, temperatura se održava na 25° C ± 2° C, pH je 7 ± 1, mulj se dobro taloži, aeracija je dovoljno dobra tako da smeša bude stalno u aerobnim uslovima, prisutne su protozoe, a aktivnost mulja se ispituje pomoću referentnih supstanci najmanje jednom u tri meseca. Mulj se obrađuje na ovakav način najmanje mesec dana pre nego što se može iskoristiti kao inokulum, ali ne duže od četiri meseca. Nakon toga, uzima se uzorak iz najmanje 10 mesta u redovnim razmacima, jednom svaka tri meseca.

Da bi se održala ista aktivnost svežeg i starog mulja, filtrirani supernatant aktivnog mulja koji se koristi pomeša se sa jednakom zapreminom filtriranog supernatanta sveže smeše prikupljene sa 10 različitih izvora i tako kombinovana tečnost održava se u kulturi, kako je opisano. Mulj se koristi kao inokulum 18 do 24 sata nakon što je jedinica napunjena.

**7.2.4. Priprema običnih sudova**

Pripremi se 6 običnih sudova:

- 100 mg/l ispitivane hemikalija u vodi za razblaživanje: običan sud br. 1;

- 100 mg/l ispitivana hemikalija u mineralnoj podlozi: običan sud br. 2, 3 i 4;

- 100 mg/l referentne hemikalije (npr. anilin) u mineralnoj podlozi: običan sud br. 5;

- samo mineralna podloga: običan sud br. 6.

Slabo rastvorljiva ispitivana hemikalija dodaje se direktno na bazi mase ili zapremine ili na način kako je opisano u Delu trećem ove metode, osim što se ne koriste ni rastvarači ni emulgatori. U sve obične sudove doda se apsorbens C.4-B u ponuđenim specijalnim posudicama. U običnim sudovima br. 2, 3 i 4 pH vrednost se svede na 7,0.

**7.2.5. Izvođenje**

Malom zapreminom inokuluma inokuliraju se obični sudovi br. 2, 3 i 4 (ispitivana suspenzija), broj 5 (kontrola aktivnosti) i broj 6 (slepa proba sa inokulumom) da se dobije koncentracija od 30 mg/l suspendovanih materija. Inokulum se ne dodaje u tikvicu broj 1, koja služi kao abiotička kontrola. Poveže se oprema i proveri da nema dotoka vazduha, pokrenu se mešalice i započne sa merenjem potrošnje kiseonika u mraku. Svakodnevno se proverava temperatura, rad mešalice i kulometrijski uređaj za zapisivanje potrošnje kiseonika i zapisuje se svaka promena u boji sadržaja običnih sudova. Potrošnja kiseonika u šest običnih sudova očitava se direktno odgovarajućim postupkom, npr. iz zapisa šesto-kanalnog čitača koji proizvodi BPK krivu. Na kraju inkubacije, obično nakon 28 dana, meri se pH sadržaja običnih sudova i određuje koncentracija rezidualne ispitivane hemikalije i svake koncentracije koja nastane u međuvremenu, a u slučaju supstanci rastvorljivih u vodi, i koncentracija DOC (videti odeljak 2.4. ove metode). Posebnu pažnju posvetiti nepostojanim hemijskim supstancama. Ako se očekuje nitrifikacija i ako je moguće određuje se koncentracija nitrata i nitrita.

*7.3. PODACI I IZVEŠTAJ*

**7.3.1. Obrada rezultata**

Potrošnja kiseonika (mg) ispitivane hemikalije u toku određenog vremena, korigovana za vrednost potrošnje kiseonika u kontrolnoj slepoj probi sa inokulumom za to isto vreme, podeli se sa masom upotrebljene ispitivane hemikalije. Ovo daje BPK izražen kao mg kiseonika/mg ispitivane hemikalije, odnosno:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| BPK = | mg potrošnja O2 ispitivane hemikalije - mg potrošnja O2 slepe probe |  |
| mg ispitivane hemikalije u običnom sudu |  |

Procenat biorazgradnje se zatim izračunava prema formuli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % biorazgradnje = % ThOD = | BPK (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) | x 100 |
| ThOD (mg O2 / mg ispitivane hemikalije) |

Za smeše, izračuna se ThOD iz elementarne analize, kao za jednostavna jedinjenja. Koristi se odgovarajuća ThOD (ThODNH4 ili ThODNO3) u zavisnosti od toga da li nitrifikacija ne postoji ili je nepotpuna (videti odeljak 2.2. ove metode). Ako nitrifikacija postoji, čak i samo delimična, radi se korekcija za kiseonik potrošen nitrifikacijom koji se izračuna iz promena u koncentracijama nitrita i nitrata (videti Deo peti ove metode).

Procenat primarne biorazgradnje izračunava se na osnovu gubitka početne hemikalije (videti odeljak 1.8.2. ove metode):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Dt = | Sb - Sa | x100 |
| Sb |

Ako se prilikom merenja fizičko-hemijskog uklanjanja izgubio deo ispitivane hemikalije u običnom sudu broj 1, to se navodi, a za izračunavanje procenta biorazgradnje koristi se koncentracija ispitivane hemikalije (Sb) u ovom običnom sudu nakon 28 dana.

Kad se odredi DOC (opciono), procenat potpune biorazgradnje računa se prema formuli:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dt = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x 100 |
| Ct - Cbt |
| C0 - Cb0 |

Kao što je opisano u odeljku 1.8.1. ove metode ako postoji gubitak DOC u običnom sudu 1, merenjem fizičko-hemijskog uklanjanja, za izračunavanje procenta biorazgradnje koristi se koncentracija DOC u ovom običnom sudu.

Rezultati se upisuju u obrasce za unos podataka.

**7.3.2. Prihvatljivost rezultata**

Potrošnja kiseonika u slepoj probi sa inokulumom obično je 20 mg/lO2 do 30 mg/l O2 i ne sme da bude veća od 60 mg/lO2 u 28 dana. Vrednosti veće od 60 mg/lO2 zahtevaju kritičko preispitivanje podataka i procedura ispitivanja. Ako pH vrednost izlazi izvan opsega od 6 do 8,5 i potrošnja kiseonika ispitivane hemikalije je manja od 60%, ispitivanje se ponavlja uz niže koncentracije ispitivane hemikalije.

Videti odeljak 1.7.2. ove metode.

Ako procenat razgradnje aninila dobijen iz potrošnje kiseonika ne prelazi 40% nakon 7 dana i 65% nakon 14 dana, rezultati ispitivanja nisu prihvatljivi.

**7.3.3. Izveštaj**

Videti odeljak 1.9. ove metode.

7.4. OBRAZAC ZA UNOS PODATAKA

Primer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA: MITI (I)

1. LABORATORIJA

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA

3. ISPITIVANA SUPSTANCA

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora: … mg/l kao hemikalija

Početna koncentracija u podlozi, C0:... mg/l kao hemikalija

Zapremina reakcione smeše, V:... ml

ThOD:... mg/l O2

4. INOKULUM

Mesta uzimanja uzoraka mulja:

1)..., 6)...,

2)..., 7)...,

3)..., 8)...,

4)..., 9)...,

5)..., 10)...,

Koncentracija suspendovanih materija u aktivnom mulju nakon aklimatizacije sa sintetičkom otpadnom vodom =... mg/l

Zapremina aktivnog mulja po litru gotove podloge =... ml

Koncentracija mulja u gotovoj podlozi =... mg/l

5. POTROŠNJA KISEONIKA: BIORAZGRADLJIVOST

Vrsta upotrebljenog respirometra:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | Vrednost (u danima) | | | | |
| 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| O2 potrošnja (mg) ispitivane hemikalije | a1 | |  |  |  |  |  |
| a2 | |  |  |  |  |  |
| a3 | |  |  |  |  |  |
| O2 potrošnja (mg) slepe probe | b | |  |  |  |  |  |
| Korigovani BPK (mg) | (a1 - b) (a2 - b) (a3 - b) | |  |  |  |  |  |
| BPK po mg ispitivane hemikalije | |  | | --- | | a - b | | C0V | | Običan sud 1 |  |  |  |  |  |
|  | Običan sud 2 |  |  |  |  |  |
|  | Običan sud 3 |  |  |  |  |  |
| % razgradnje   |  |  | | --- | --- | | BPK | x 100 | | ThOD | |  | 1 |  |  |  |  |  |
|  | 2 |  |  |  |  |  |
|  | 3 |  |  |  |  |  |
|  | Srednja vrednost\* |  |  |  |  |  |
| (\*) Srednja vrednost se ne sme koristiti ako postoje znatne razlike između dva merenja. | | | | | | | |

Napomena: Slični obrasci mogu se koristiti za referentnu supstancu.

6. ANALIZA UGLJENIKA (nije obavezno)

Analizator ugljenika

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Običan sud | DOC | | | | % uklonjenog DOC | Srednja vrednost |
| izmereno | | korigovano | |
| Voda + ispitivana supstanca | a |  |  |  | - | - |
| Mulj + ispitivana supstanca | b1 |  | b1 - c |  |  |  |
| Mulj + ispitivana supstanca | b2 |  | b2 - c |  |  |  |
| Mulj + ispitivana supstanca | b3 |  | b3 - c |  |  |  |
| Kontrola slepom probom | c |  | - |  | - | - |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % uklonjenog DOC = | a1 - (b - c) | x 100 |
| a |

7. PODACI SPECIFIČNE HEMIJSKE ANALIZE

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l) | % razgradnje |
| Ispitivanje slepe probe sa vodom | Sb |  |
| Inokulisana ispitivana podloga | Sa1 |  |
| Sa2 |  |
| Sa3 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % razgradnje = | Sb - Sa | x 100 |
| Sb |

Izračunava se procenat razgradnje za obične sudove a1, a2 i a3.

8. NAPOMENE

Ako je moguće priložiti BPK krivu u funkciji vremena.

**Deo drugi**

**IZRAČUNAVANJE I ODREĐIVANJE ODGOVARAJUĆIH UKUPNIH PARAMETARA**

U zavisnosti od izabrane metode ispitivanja, zahtevaju se određeni zbirni parametri. Ovaj deo opisuje postupak dobijanja njihovih vrednosti. Upotreba ovih parametara data je u pojedinim metodama ispitivanja.

**1. SADRŽAJ UGLJENIKA**

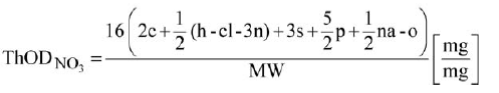
Sadržaj ugljenika izračunava se iz poznatog sastava elemenata ili elemenata određenih analizom ispitivane supstance.

**2. TEORIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA (ThOD)**

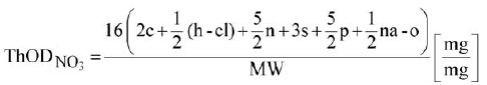
Teorijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: ThOD) može se izračunati ako je sastav elemenata poznat ili određen analizom elemenata. To je za jedinjenje:

CcHhClclNnNanaOoPpSs

bez nitrifikacije,



ili sa nitrifikacijom



**3. HEMIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA (HPK)**

Hemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: HPK) određuje se prema Metodi C.6. koja je data u ovom prilogu.

**4. RASTVORENI ORGANSKI UGLJENIK (DOC)**

Rastvoreni organski ugljenik (u daljem tekstu: DOC) jeste organski ugljenik bilo koje hemikalije ili smeše u vodi koji prolazi kroz filter promera 0,45 µ.

Izvuku se uzorci iz posuda za ispitivanje i odmah filtriraju u filtracijskom uređaju koji koristi odgovarajući membranski filter. Prvih 20 ml (količina se može smanjiti kad se koriste mali filteri) filtrata se bacaju. Zapremine od 10 ml do 20 ml ili manje, ako se injektiraju (zapremina zavisi od količine koja je potrebna za analizator ugljenika) zadržavaju se zbog analize ugljenika. Koncentracija DOC određuje se pomoću analizatora organskog ugljenika koji može tačno da izmeri koncentraciju ugljenika koja je jednaka ili niža od 10% početne koncentracije DOC korišćene u ispitivanju.

Filtrirani uzorci koji se ne mogu analizirati istog dana mogu da se sačuvaju u frižideru na temperaturi od 2° C do 4° C u toku 48 sata ili na temperaturi ispod - 18° C u toku dužeg perioda.

Napomene:

Membranski filteri su često impregnirani površinski aktivnim materijama za hidrofilizaciju. Zato filter može sadržati do nekoliko mg rastvorenog organskog ugljenika koji utiče na određivanje biorazgradljivosti. Površinski aktivne materije i druga rastvorljiva organska jedinjenja uklanjaju se iz filtera kuvanjem filtera u dejonizovanoj vodi tri puta po sat vremena. Filteri se mogu čuvati u vodi nedelju dana. Ako se koriste jednokratna punjenja filtera, svako punjenje se proverava da bi se potvrdilo da ne otpušta rastvorljivi organski ugljenik.

Membranski filter, zavisno od tipa, može usled adsorpcije zadržati test supstancu. Poželjno je proveriti da li filter zadržava ispitivanu hemikaliju.

Centrifugiranje na 40.000 m/s2 (4.000 g) u toku 15 minuta može se koristiti umesto filtracije za razlikovanje TOC od DOC. Postupak nije pouzdan pri početnim koncentracijama manjim od 10 mg DOC/l, s obzirom na to dali su ili nisu uklonjene sve bakterije ili se ugljenik kao deo bakterijske plazme ponovno rastvorio.

**LITERATURA**

1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. COntrol Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

2. Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

3. DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

4. Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble COmpounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

**Deo treći**

**PROCENA BIOLOŠKE RAZGRADLJIVOSTI SLABO RASTVORLJIVIH SUPSTANCI**

U ispitivanju biorazgradnje slabo rastvorljivih supstanci, posebnu pažnju posvetiti sledećim aspektima:

Dok su homogene tečnosti retko problem za uzimanje uzoraka, preporučuje se da čvrste supstance budu homogenizovane odgovarajućim sredstvima kako bi se izbegle greške usled nehomogenosti. Posebno se pazi kad su potrebni reprezentativni uzorci od nekoliko miligrama iz smeše hemikalija ili supstanci sa velikom količinom nečistoća.

Tokom ispitivanja mogu se koristiti različiti oblici mešanja. Hemikalija se meša tek toliko da ostane dispergovana. Pregrejavanje, prekomerno stvaranje pene i preterane vučne sile izbegavaju se.

Može se koristiti emulgator koji omogućava stabilnu disperziju hemikalije. Emulgator ne sme da bude toksičan za bakterije i ne sme da bude biorazgradljiv ili da uzrokuje stvaranje pene u ispitivanim uslovima.

Na rastvarače se primenjuju isti kriterijumi kao i na emulgatore.

Ne preporučuje se korišćenje čvrstih nosača za ispitivane čvrste supstance, ali oni mogu biti pogodni samo za supstance.

Kad se koriste pomoćne supstance kao što su emulgatori, rastvarači i nosači, ispituje se posuda sa slepom probom koja sadrži te pomoćne supstance.

Za ispitivanje biorazgradljivosti slabo rastvorljivih jedinjenja može se koristiti bilo koji od tri respirometrijska ispitivanja: C.4-B, BPK, MITI.

**LITERATURA**

1. de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble COmpounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

2. Gerike, P, The Biodegradability testing of poorly water soluble COmpounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

**Deo četvrti**

**PROCENA BIORAZGRADLJIVOSTI HEMIKALIJA ZA KOJE SE SUMNJA DA SU TOKSIČNE ZA INOKULUM**

Kad se ispitivana hemikalija podvrgne ispitivanju biorazgradljivosti i pokaže se da nije brzo biorazgradljiva, preporučuje se sledeći postupak za utvrđivanje razlika između inibicije i inercije**1**:

Za ispitivanja toksičnosti i biorazgradnje, koristiti slične ili identične inokulume.

Da bi se ispitivanjem brze biorazgradljivosti procenila toksičnost hemikalije, primenjuje se jedan ili kombinacija postupaka za utvrđivanje inhibicije stepena respiracije mulja (ispitivanje inhibicije respiracije aktivnog mulja, videti u literaturi**2**), BPK, odnosno postupaka za utvrđivanje inhibicije rasta.

Ako je potrebno izbeći inhibiciju izazvanu toksičnošću, preporučuje se da koncentracije ispitivane supstance koja se koristi u ispitivanju brze biološke razgradljivosti budu manje od 1/10 EC50 vrednosti (ili manje od EC20 vrednosti) koja se dobije ispitivanjem toksičnosti. Jedinjenja sa EC50 vrednošću većom od 300 mg/l najverovatnije nemaju toksične efekte u ispitivanju brze biorazgradljivosti.

EC50 vrednosti manje od 20 mg/l verovatno predstavljaju ozbiljne probleme za dalje testove. Koriste se niske ispitivane koncentracije, zbog čega se koristi stroga i osetljiva metoda ispitivanja u zatvorenoj boci ili materijal označen izotopom ugljenika C14. Alternativno, ako se radi sa aklimatizovanim inokulumom, koriste se više koncentracije ispitivane supstance. U tom slučaju, gubi se specifični kriterijum metode ispitivanja brze biološke razgradljivosti.

**LITERATURA**

1. Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

2. Directive 87/302/EEC.

**Deo peti**

**KOREKCIJA POTROŠNJE KISEONIKA ZBOG UTICAJA NITRIFIKACIJE**

Greške zbog propusta da se uračuna nitrifikacija u procenu biorazgradljivosti ispitivane supstance koja ne sadrži N na osnovu potrošnje kiseonika su marginalne (ne veće od 5%), čak i ako je pojava oksidacije amonijačnog azota u podlozi vrlo nepravilna, kao između posuda za ispitivanje i posuda sa slepom probom. Kad ispitivane supstance sadrže N, mogu se javiti ozbiljne greške.

Ako je došlo do nitrifikacije, ali ona nije potpuna, opažena potrošnja kiseonika reakcione smeše može se korigovati za količinu kiseonika potrošenog u oksidaciji amonijaka na nitrite i nitrate, ako se promene u koncentraciji u toku inkubacije nitrita i nitrata određuju pomoću jednačina:

2NH4Cl+3O2=2HNO2+2HCl+2H2O [1]

2HNO2+O2=2HNO3 [2]

Ukupno:

2NH4Cl+4O2=2HNO2+2HCl+2H2O [3]

Iz jednačine [1] vidi se da 28 g azota iz amonijum hlorida (NH4Cl) potroši 96 g kiseonika u toku oksidacije do nitrita, odnosno faktor je 3,43 (96/28). Na isti način, iz jednačine [3] vidi se da 28 g azota potroši 128 g kiseonika u toku oksidacije do nitrata, odnosno faktor je 4,57 (128/28).

S obzirom da su reakcije sekvencijalne, a za njih su zaslužne različite bakterijske vrste, koncentracija nitrita se može povećati ili smanjiti. Dakle:

O2 potrošen u stvaranju nitrata = 4,57 x povećanje koncentracije nitrata [4]

i

O2 potrošen u stvaranju nitrata = 3,43 x povećanje koncentracije nitrata [5]

i

gubitak O2 zbog gubljenja nitrata = -3,43 x smanjenje koncentracije nitrata [6]

tako da je:

O2 potrošnja zbog nitrifikacije = ±3,43 x promena konc. nitrita + 4,57 x povećanje koncentracije nitrita [7]

i stoga je:

O2 potrošnja zbog C oksidacije = ukupna opažena potrošnja zbog nitrifikacije. [8]

Alternativno, ako se određuje samo ukupni oksidovani N, može se prihvatiti da je potrošnja kiseonika zbog nitrifikacije, kao prva aproksimacija, 4,57 puta povećanje u oksidovanom N.

Korigovana vrednost za potrošnju kiseonika zbog C oksidacije se onda poredi sa ThODNH3, kao što je izračunato u Delu drugom ove metode.

**C.5. RAZGRADNJA - BIOHEMIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Cilj ove metode je merenje biohemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: BPK) za čvrste i tečne organske supstance.

Podaci dobijeni u ovom ispitivanju odnose se na jedinjenja rastvorljiva u vodi. Mogu se ispitivati i jedinjenja koja su isparljiva, kao i jedinjenja koja su slabo rastvorljiva u vodi.

Metoda se može primeniti samo za one organske supstance koje ne deluju inhibitorno na bakterije u koncentracijama koje se koriste u ispitivanju. Ako ispitivana supstanca nije rastvorljiva u izabranim koncentracijama, dodatne mere (kao što je ultrazvučna disperzija) mogu se koristiti kako bi se postigla dobra disperzija ispitivane supstance.

Podaci o toksičnosti ispitivane supstance mogu da budu korisni pri tumačenju rezultata ispitivanja gde su dobijene male vrednosti za BPK, a pomažu i u izboru odgovarajućih koncentracija za ispitivanje date supstance.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Biohemijska potrošnja kiseonika (BPK) jeste masa rastvorenog kiseonika potrebna za proces biohemijske oksidacije u specifičnoj zapremini rastvora ispitivane supstance pod uslovima definisanim za ovo ispitivanje.

Rezultati se izražavaju u gramima kao g BPK/g ispitivane supstance.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Poželjno je koristiti adekvatne referentne supstance da bi se proverila aktivnost inokuluma.

*1.4. PRINCIP METODE*

Unapred određena količina ispitivane supstance, koja je rastvorena ili dispergovana u dobro aerisanom medijumu, inokulira se sa mikroorganizmima i inkubira na tačno određenoj konstantnoj temperaturi u odsustvu svetlosti.

BPK se određuje kao razlika sadržaja rastvorenog kiseonika na početku i na kraju ispitivanja. Ispitivanje traje najmanje pet dana, ali ne duže od 28 dana.

Kao slepu probu koristiti rezultate naporednog ispitivanja bez prisustva ispitivane supstance.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Određivanje BPK ne može da se smatra validnom merom biorazgradljivosti ispitivane supstance. Ovo ispitivanje se može posmatrati samo kao skrining test.

*1.6. OPIS METODE*

Preliminarni rastvor ili disperzija pripremaju se tako da se postigne odgovarajuća koncentracija BPK kompatibilna sa metodom koja se koristi. BPK se zatim određuje primenom bilo koje odgovarajuće standardizovane metode.

**2. PODACI I PROCENA**

BPK za preliminarni rastvor ispitivane supstance izračunava se prema izabranoj standardizovanoj metodi i izražava se u gramima BPK po gramu ispitivane supstance.

**3. IZVEŠTAJ**

U izveštaju o ispitivanju navodi se koja metoda je korišćena u ispitivanju.

Vrednost BPK predstavlja srednju vrednost za najmanje tri validna merenja.

Navode se i svi podaci i napomene relevantne za tumačenje rezultata, a posebno podaci koji su u vezi sa nečistoćama, fizičkim karakteristikama, toksičnim efektom i sastavom ispitivane supstance.

U izveštaju se navodi i upotreba aditiva koji se koriste radi sprečavanja biološke nitrifikacije.

**4. LITERATURA**

Lista standardizovanih metoda:

1. NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

2. NBN 407: Biochemical oxygen demand.

3. NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

4. The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

5. ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

**C.6. RAZGRADNJA - HEMIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Cilj ove metode je merenje hemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: HPK) za čvrste i tečne organske supstance, u tačno definisanim laboratorijskim uslovima.

Poznavanje hemijske formule supstance korisno je za izvođenje metode ispitivanja kao i za tumačenje dobijenih rezultata (npr. soli halogenih elemenata, organske soli gvožđa, organohlorna jedinjenja).

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Hemijska potrošnja kiseonika (HPK) jeste mera sposobnosti neke supstance da bude oksidovana, a izražava se kao ekvivalentna količina kiseonika oksidujućeg sredstva koja je potrebna za oksidaciju supstance u tačno definisanim laboratorijskim uslovima.

Rezultat se izražava u gramima, kao g HPK/g ispitivane supstance.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se ne koriste u svim slučajevima prilikom testiranja novih supstanci. Referentne supstance služe prvenstveno za periodičnu kalibraciju metode i omogućavaju poređenje rezultata ukoliko se primenjuje neka druga metoda.

*1.4. PRINCIP METODE*

Unapred određena količina ispitivane supstance koja je rastvorena ili dispergovana u vodi, se oksiduje sa kalijum dihromatom u medijumu zakiseljenom sa sumpornom kiselinom i sa srebro-sulfatom kao katalizatorom, pod refluksom u toku 2 sata. Preostali dihromat se određuje titracijom pomoću standardizovanog gvožđe-amonijum sulfata.

U slučaju da ispitivane supstance sadrže hlor, dodati živu-sulfat**III** da bi se smanjila interferencija hlorida.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**III** Nakon upotrebe, rastvori koje sadrže živine soli tretiraju se da bi se izbeglo ispuštanje žive u životnu sredinu.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Zbog arbitrarnog načina određivanja, HPK je "indikator sposobnosti oksidovanja", pa se ova metoda koristi kao praktičan postupak za određivanje sadržaja organske materije.

Hloridi mogu da utiču na ovo ispitivanje. Neorganska redukujuća ili oksidujuća sredstva takođe mogu da utiču na određivanje HPK.

Neka ciklična jedinjenja i mnoge isparljive supstance (npr. niže masne kiseline) ne mogu se potpuno oksidovati primenom postupka opisanog u ovoj metodi.

*1.6. OPIS METODE*

Pripremi se preliminarni rastvor ili disperzija ispitivane supstance da se dobije HPK između 250 mg/l i 600 mg/l.

Napomene:

U slučaju da se radi o slabo rastvorljivim supstancama ili supstancama koje se ne mogu dispergovati, može se odmeriti količina praškaste supstance ili supstance u tečnom obliku koja odgovara količini od 5 mg HPK i staviti u posudu sa vodom.

HPK se često, i naročito u slučaju slabo rastvorljivih supstanci, pogodno određuje modifikacijom postupka, odnosno u zatvorenom sistemu sa izjednačavanjem pritiska**1**. Primenom ove modifikovane metode, supstance za koje nisu prikladne konvencionalne metode, kao npr. sirćetna kiselina, mogu se uspešno kvantifikovati. U slučaju piridina ova metoda nije primenljiva.

Ukoliko se koncentracija kalijum dihromata, kao što je preporučeno u literaturi**1**, poveća na 0,25 N (0,0416 M), olakšano je direktno merenje 5 mg do 10 mg supstance, što je neophodno za određivanje HPK za slabo rastvorljive supstance**2**.

U ostalim slučajevima, HPK se određuje primenom bilo koje odgovarajuće domaće ili međunarodne standardizovane metode ispitivanja.

**2. PODACI I PROCENA**

HPK u posudi izračunava se prema izabranom normalizovanom postupku i pretvara se u grame HPK po gramu ispitivane supstance.

**3. IZVEŠTAJ**

U izveštaju o ispitivanju navodi se koja metoda je korišćena pri ispitivanju.

HPK predstavlja srednju vrednost najmanje tri merenja. Navode se svi podaci i napomene merodavne za tumačenje rezultata, naročito one koje se odnose na prisustvo nečistoća i svojstva ispitivane supstance (ako su poznata), koja bi mogla uticati na rezultate.

Navodi se i da li je korišćen živin sulfat u cilju smanjenja uticaja hlorida.

**4. LITERATURA**

1. NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

2. ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

3. NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

4. DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

5. DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

6. NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

7. ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

**C.7. RAZGRADNJA - ABIOTIČKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KAO FUNKCIJA pH**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 111 (2004).

*1.1. UVOD*

Hemikalije mogu dospeti u površinske vode direktnim unošenjem, raspršivanjem, izlivanjem, drenažom ili kao posledica odlaganja otpada iz industrije, domaćinstava i poljoprivrede, iz otpadnih voda ili atmosfere. Dospele hemikalije u površinskim vodama mogu biti transformisane hemijski (npr. hidroliza, oksidacija), fotohemijski, odnosno mikrobiološki. Ova metoda opisuje laboratorijsku metodu ispitivanja za procenu abiotičke hidrolitičke transformacije hemikalija u vodenim sistemima pri vrednostima pH koje su uobičajeno karakteristične (pH 4-9) i bazira se na uputstvima**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**.

Eksperimenti se izvode u cilju određivanja:

1) stepena hidrolize ispitivane supstance u funkciji pH i

2) prirode/načina i stepena obrazovanja i smanjenja produkata hidrolize kojima organizmi mogu biti izloženi.

Ovi eksperimenti mogu da budu obavezni za hemikalije koje se direktno primenjuju na površinske vode ili za hemikalije za koje postoji veliki stepen verovatnoće da će dospeti u životnu sredinu nekim od puteva unosa navedenim u ovom odeljku.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

U svim ispitivanjima koriste se merne jedinice koje su obuhvaćene Međunarodnim sistemom jedinica (SI).

Ispitivana supstanca jeste bilo koja supstanca, odnosno polazna supstanca ili odgovarajući produkt hidrolize.

Produkti transformacije jesu sve supstance koje nastaju kao produkt u reakcijama biotičke ili abiotičke transformacije.

Produkti hidrolize jesu sve supstance koje nastaju kao produkti hidrolitičke transformacije ispitivane supstance.

Hidroliza jeste reakcija ispitivane supstance (u daljem tekstu: RH) sa vodom, sa zamenom H grupe sa OH grupom:

RH + HOH → ROH + HH [1]

Stopa kojom se koncentracija RH smanjuje u pojednostavljenom postupku predstavlja se formulama:

stopa = k[H2O][RH], za reakcije drugog reda ili

stopa = k[RH], za reakcije prvog reda,

u zavisnosti od koraka kojim se određuje stopa.

S obzirom na to da je voda prisutna u znatno većoj količini u odnosu na ispitivanu supstancu, ovaj tip reakcije se uobičajeno opisuje kao reakcija pseudo-prvog reda u kojoj je zabeležena konstanta data odnosom:

kobs = k[H2O] [2]

i može biti određena izrazom**IV**:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| kobs = | 1 | 1n | C0 | [3] |
| t | Ct |

pri čemu:

t jeste vreme;

C0, Ct jesu koncentracije RH u vremenu 0 i t.

Jedinica mere ove konstante jeste (vreme)-1.

Poluvreme reakcije jeste vreme potrebno za reakciju 50% RH koje se određuje formulom:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| t0.5 = | 1n2 | [4] |
| kobs |

Vreme poluživota (t0,5) jeste vreme potrebno za 50% hidrolizu ispitivane supstance kada se hidroliza može opisati kinetikom prvog reda. Ova vrednost je nezavisna od koncentracije.

Vreme nestajanja 50 (u daljem tekstu: DT50) jeste vremenski period u okviru kojeg se koncentracija ispitivane supstance smanji za 50%. Razlikuje se od parametra t0,5 kada se hidroliza ne može opisati kao kinetika prvog reda.

Procena k na različitim temperaturama

Kada su poznate konstante stepena hidrolize za dve temperature, konstante stepena za druge temperature mogu se izračunati Arheniusovom jednačinom:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| k = | A x e | E |  |
| R x T |  |

ili

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1nk = | 1nA - | E |  |
| R x T |  |

Grafički prikaz odnosa lnk prema 1/T daje pravu sa nagibom − E/R, pri čemu:

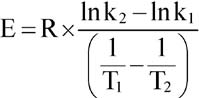
K jeste konstanta stepena hidrolize, merena na različitim temperaturama;

E jeste energija aktivacije (kJ/mol);

T jeste apsolutna temperatura (T);

R jeste gasna konstanta (8.314 J/mol.K).

Energija aktivacije izračunava se regresionom analizom jednačinom:



pri čemu je T2> T1.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**IV** Ukoliko se na grafičkom prikazu log-transformisanih podataka u funkciji vremena ne uočava linearna povezanost (u skladu sa konstantom prvog reda), upotreba jednačine [3] nije adekvatna za određivanje konstante stepena hidrolize ispitivane supstance.

*1.3. PRIMENA METODE*

Metoda se primenjuje za hemijske supstance (obeležene ili neobeležene) za koje postoji dovoljno precizna i osetljiva analitička metoda. Metoda može da se primeni i za supstance koje nisu ili su u manjoj meri isparljive ukoliko su rastvorljive u vodi. Metodu ne primenjivati za hemikalije koje su u vodenim rastvorima lako isparljive (npr. fumiganti, organski rastvarači) i koje ne mogu da obrazuju stabilne rastvore u ispitivanim uslovima propisanim za ovu metodu. Ova metoda nije prikladna za supstance slabo rastvorljive u vodi.

*1.4. PRINCIP METODE*

Sterilni vodeni rastvori pufera različitih pH vrednosti (pH 4, 7 i 9) u kojima je rastvorena ispitivana supstanca inkubiraju se u mraku u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (na konstantnoj temperaturi). Nakon odgovarajućeg vremena, puferski rastvori se analiziraju na ispitivanu supstancu i na produkte hidrolize. Ukoliko se ispituju obeležene supstance (npr. C14), može se lakše uspostaviti maseni bilans.

Ova metoda ispitivanja izvodi se kao etapni pristup koji je dat u Delu drugom ove metode. Izbor naredne etape ispitivanja određen je rezultatima prethodne etape.

*1.5. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Neobeležene ili obeležene supstance mogu se koristiti za merenje stepena hidrolize. Prednost za proučavanje puteva hidrolize i za uspostavljanje masenog balansa daje se obeleženim supstancama. U specijalnim slučajevima obeležavanje supstanci nije neophodno. Preporučuje se obeležavanje supstanci sa C**14**, ali se mogu upotrebljavati i drugi izotopi kao što su C13, N15, H3. Koliko je god moguće, potrebno je obeležiti najstabilniji deo molekula. Na primer, ukoliko ispitivana supstanca sadrži jedan prsten, obeležavanje ovog prstena je obavezno; ukoliko supstanca sadrži dva ili više prstena, potrebno je izvesti dodatne eksperimente da bi se procenila sudbina svakog pojedinačnog prstena koji je obeležen da bi se dobili podaci o obrazovanju produkata hidrolize. Procenat čistoće supstance da bude najmanje 95%.

Pre izvođenja ispitivanja, potrebno je o ispitivanoj supstancimati podatke:

- rastvorljivost u vodi (videti Metodu A.6. koja je data u ovom pravilniku);

- rastvorljivost u organskim rastvaračima;

- napon pare (videti Metodu A.4. koja je data u ovom pravilniku) i Henrijeva konstanta;

- podeoni koeficijent n-oktanol/voda (videti Metodu A.8. koja je data u ovom pravilniku);

- konstantna disocijacije pKa (videti u literaturi**9**);

- stepen direktne i indirektne fototransformacije u vodi, ukoliko je potrebno.

Treba da budu poznati i podaci o analitičkim metodama za kvantifikaciju ispitivane supstance i ukoliko je relevantno, podaci o metodama za identifikaciju i kvantifikaciju produkata hidrolize u vodenim rastvorima (videti odeljak 1.7.2. ove metode).

*1.6. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance, kada je moguće, koriste se za identifikaciju i kvantifikaciju produkata hidrolize primenom spektroskopskih i hromatografksih metoda ili neke druge dovoljno osetljive metode.

*1.7. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.7.1. Efikasnost primenjene analitičke metode**

Analiza puferskih rastvora ili njihovih ekstrakata neposredno nakon dodavanja ispitivane supstance u najmanje dva ponavljanja daje prve indicije o efikasnosti analitičke metode i ujednačenosti primene izabranog postupka za ispitivanu supstancu. Efikasnost za dalje faze eksperimenta određuje se na osnovu razlike mase (kada se koristi obeleženi materijal). Procenat efiskasnosti iznosi od 90% do 110% za obeležene i neobeležene hemikalije**7**. U slučaju da postoje tehničke poteškoće da se zadovolji ovaj kriterijum, efikasnost od 70% je prihvatljiva za neobeležene hemikalije, uz dodatno objašnjenje.

**1.7.2. Ponovljivost i osetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode kojom se kvantifikuje ispitivana supstanca i kasnije produkti hidrolize može se proveriti analizom puferskog rastvora (ili njihovih ekstrakata) u dva ponavljanja nakon što se obrazuju produkti hidrolize u dovoljnim količinama za kvantifikaciju.

Analitička metoda treba da je dovoljno osetljiva za kvantifikaciju do najviše 10% od početne koncentracije supstance. Ukoliko je relevantno, analitička metoda treba da bude dovoljno osetljiva i za kvantifikaciju bilo kojih produkata hidrolize koji predstavljaju 10% ili više (u bilo kom vremenu u periodu ispitivanja) od primenjene koncentracije, do 25% ili manje od najviše koncentracije.

**1.7.3. Intervali poverenja za kinetičke podatke o hidrolizi**

Intervali poverenja se izračunavaju za sve koeficijente regresione prave, konstante, vreme poluživota i bilo koje druge kinetičke parametre (npr. DT50).

*1.8. OPIS METODE*

**1.8.1. Oprema i instrumenti**

Eksperimenti se izvode u staklenim posudama (npr. epruvetama, tikvicama) u mraku i u sterilnim uslovima, ukoliko je neophodno, osim ukoliko preliminarni podaci (kao što je podeoni koeficijent n-oktanol/voda) ukazuju na to da supstanca prijanja za staklene površine. U tim slučajevima, može se razmatrati upotreba drugih materijala (kao što je teflon). Problem prijanjanja (adhezije) na staklo može se rešiti i:

- određivanjem mase ispitivane supstance i produkata hidrolize koji su sorbovani na zidove posude;

- upotrebom ultrazvučnih kupatila;

- spiranjem sa zidova posude sa rastvaračem pri svakom uzimanju uzoraka za analizu;

- korišćenjem formulisanih proizvoda;

- upotrebom dodatnih rastvarača za uvođenje ispitivane supstance u sistem, dodatni rastvarač ne sme da utiče na hidrolizu supstance.

Vodena kupatila sa mešalicom ili inkubatori sa termoregulacijom potrebni su za inkubaciju rastvora različitih koncentracija ispitivane supstance.

Potrebna je standardna laboratorijska oprema koja sadrži:

- pH-metar;

- instrumente za analitička merenja kao što su GC, HPLC, TLC uključujući i odgovarajuće sisteme za detekciju supstanci obeleženih ili neobeleženih radioizotopima ili metoda inverznog razblaženja izotopa;

- instrumente za identifikaciju (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, itd.);

- tečni scintilatorski brojač;

- separacione levkove za tečno-tečnu ekstrakciju;

- opremu za koncentrovanje rastvora i ekstrakata (npr. rotirajući evaporator);

- opremu za održavanje temperature (npr. vodeno kupatilo).

Hemijski reagensi uključuju:

- organske rastvarače, analitičke čistoće, kao što je heksan, dihlorometan, itd;

- tečnost za scintilatorski brojač;

- puferski rastvori (videti odeljak 1.8.3. ove metode).

Sve staklene posude, redestilovana voda i puferski rastvori koji se koriste sterilni su.

**1.8.2. Uvođenje ispitivane supstance**

Ispitivana supstanca se uvodi u puferski sistem u obliku vodenog rastvora (videti Deo četvrti ove metode). Upotreba malih količina rastvora koji se dobro mešaju sa vodom (kao što je acetonitril, aceton, etanol) dozvoljena je za uvođenje i distribuciju ispitivane supstance, ali količina ne treba da bude veća od 1% v/v. U slučaju da se razmatra upotreba veće količine rastvarača (npr. kod slabo rastvorljivih supstanci), ovo se može dozvoliti samo ako se dokaže da rastvarač nema uticaj na hidrolizu ispitivane supstance.

Za rutinsku upotrebu ne preporučuju seformulisani proizvodi, jer se ne može isključiti mogućnost da sastojci formulacije utiču na proces hidrolize. Za slabo rastvorljive supstance ili za supstance koje prijanjaju na staklene površine (videti odeljak 1.8.1. ove metode) upotreba formulisanih proizvoda može da bude odgovarajuća alternativa.

Ispituje se samo jedna koncentracija ispitivane supstance. Koncentracija ne sme da prelazi 0,01M ili polovinu koncentracije zasićenog rastvora.

**1.8.3. Puferski rastvori**

Ova metoda ispitivanja izvodi se pri vrednostima pH od 4, 7 i 9. Za potrebe ovog ispitivanja, puferski rastvori se pripremaju sa hemikalijama analitičke čistoće i redestilovanom vodom. Neki od puferskih sistema koji se koriste dati su u Delu trećem ove metode. Puferski sistem može da utiče na hidrolizu i ukoliko se uoče promene koristi se drugi puferski sistem.

Vrednosti pH svakog puferskog rastvora proveravati sa kalibrisanim pH-metrom sa preciznošću najmanje 0,1 u definisanim temperaturnim uslovima.

**1.8.4. Uslovi ispitivanja**

*1.8.4.1. Temperatura*

Ispitivanja hidrolize izvoditi na konstantnoj temperaturi. Radi ekstrapolacije rezultata, neophodno je održavati temperaturu sa minimalnim variranjem ± 0,5° C.

Preliminarno ispitivanje (Etapa 1) izvodi se na temperaturi od 50° C ukoliko se ne raspolaže podacima o načinu hidrolize supstance. Naredne etape kinetičkih ispitivanja izvode se na najmanje tri različite temperature (uključujući i ispitivanje na temperaturi od 50° C) osim ako je preliminarnim ispitivanjem (Etapa 1) dokazano da supstanca ne podleže hidrolizi. Preporučeni temperaturni opseg je 10° C do 70° C (poželjno je da se najmanje jedno ispitivanje izvede na temperaturi manjoj od 25° C) koji obuhvata ne samo temperaturu od 25° C za koju se podnosi izveštaj o ispitivanju, već i većinu vrednosti temperatura zabeleženih u prirodnim uslovima.

*1.8.4.2. Osvetljenje i kiseonik*

Za ispitivanje hidrolize potrebno je izabrati odgovarajuću metodu za minimiziranje fotolitičkih efekata. Preduzimaju se odgovarajuće mere za sprečavanje oksidacije (npr. uduvavanjem helijuma, azota ili argona 5 minuta pre pripreme rastvora).

*1.8.4.3. Trajanje ispitivanja*

Preliminarno ispitivanje (Etapa 1) traje 5 dana. Naredne etape ispitivanja traju sve dok se 90% ispitivane supstance ne hidrolizuje ili 30 dana, zavisno od toga koji uslov se pre ispuni.

**1.8.5. Izvođenje ispitivanja**

*1.8.5.1. Preliminarno ispitivanje (Etapa 1)*

Preliminarno ispitivanje se izvodi na temperaturi od 50° C ± 0,5° C pri vrednostima pH od 4, 7 i 9. Ukoliko ispitivana supstanca hidrolizuje manje od 10% u toku perioda od 5 dana, (t0,5 25°C > 1 godine) za tu supstancu se smatra da ne podleže hidrolizi i nije potrebno dalje ispitivanje. Ako je za supstancu dokazano da podleže hidrolizi na ambijentalnoj temperaturi**V** nije neophodno preliminarno ispitivanje. Analitička metoda je potrebno da bude dovoljno precizna i osetljiva da se može detektovati 10% redukcije početne koncentracije ispitivane supstance.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**V** Ovi podaci mogu da potiču od drugih izvora kao što su: podaci o hidrolizi strukturno sličnih jedinjenja iz literature ili drugih preliminarnih, semi-kvantitativnih ispitivanja hidrolize sa ispitivanom supstancom u fazama razvijanja metode.

*1.8.5.2. Hidroliza nestabilnih supstanci (Etapa 2)*

Sledeća etapa ispitivanja izvodi se pri pH vrednostima pri kojima je data ispitivana supstanca nestabilna, a što je dokazano preliminarnim ispitivanjem. Puferski rastvori ispitivane supstance temperiraju se na izabranoj temperaturi. Za ispitivanje kinetike prvog reda, svaki rastvor ispitivane supstance analizira se u određenim vremenskim intervalima što omogućava dobijanje najmanje šest pravilno raspoređenih vrednosti u opsegu od 10% do 90% hidrolize ispitivane supstance. Po jedan uzorak supstance uzima se za merenje u šest vremenskih intervala (ukoliko je ispitivanje postavljeno u najmanje dva ponavljanja u odvojenim posudama) i izuzima iz ispitivanja (dobija se set podataka od najmanje dvanaest vrednosti). Nije adekvatno postavljanje ispitivanja samo sa jedinstvenim uzorkom iz koga će se uzimati pojedinačne alikvote za merenja u vremenskim intervalima, jer ne omogućava analizu varijabilnosti podataka i može da dovede do kontaminacije rastvora ispitivane supstance. Ispitivanja kojima se utvrđuje da su eksperimentalni uslovi sterilni izvode se na kraju završnih etapa, odnosno nakon hidrolize 90% ispitivane supstance ili nakon 30 dana. Ako se ne uočava razgradnja (transformacija) supstance, nije neophodno izvoditi ova ispitivanja.

*1.8.5.3. Identifikacija produkata hidrolize (Etapa 3)*

Sve važnije produkte hidrolize, odnosno one produkte koji predstavljaju najmanje 10% primenjene doze ispitivane supstance identifikovati odgovarajućim analitičkim metodama.

*1.8.5.4. Dodatna ispitivanja*

Za ispitivanje supstanci koji ne podležu hidrolizi mogu biti neophodna dodatna ispitivanja koja se izvode pri različitim vrednostima pH od 4, 7 i 9.

Na primer, kod proučavanja fizioloških procesa može biti potrebno izvoditi ispitivanje u kiseloj sredini (npr. pH 1,2) pri temperaturnim uslovima koji su fiziološki relevantni (37° C).

**2. PODACI**

Količina ispitivane supstance i produkata hidrolize izražava se u procentima u odnosu na primenjenu početnu koncentraciju ispitivane supstance, i kada je prikladno, u mg/l za svaki vremenski interval merenja i pri svim pH vrednostima i temperaturama. Kada se u ispitivanju koriste obeležene supstance maseni balans se izražava u procentima u odnosu na primenjenu početnu koncentraciju.

Rezultati ispitivanja predstavljaju se grafički: log-transformisani podaci za koncentraciju ispitivane supstance u funkciji vremena. Treba identifikovati sve važnije produkte hidrolize, odnosno produkte koji predstavljaju najmanje 10% primenjene doze ispitivane supstance. Podatke za koncentraciju produkata hidrolize transformisati u log-transformisane podatke (identično kao i za ispitivanu supstancu) da bi se uočio stepen obrazovanja i smanjenja produkata hidrolize.

*2.1. OBRADA PODATAKA*

Preciznije izračunavanje vrednosti poluživota ili vrednosti DT50 postiže se primenom odgovarajućih kinetičkih modela. Vrednosti poluživota, odnosno vrednosti DT50 (uključujući i intervale poverenja) prikazuju se za svaku pH vrednost i temperaturu sa opisom korišćenog modela, stepenom kinetike i koeficijenta korelacije (r2). Ove računice mogu se primeniti za produkte hidrolize.

Kada se ispitivanja izvode na različitim temperaturama, konstante hidrolize pseudo-prvog reda (kobs) opisati u funkciji temperature. Izračunavanja se zasnivaju na raščlanjivanju vrednosti kobs na vrednosti konstante za hidrolizu u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini (kH, kneutral i kOH) i Arheniusovoj jednačini:

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s093.gif

pri čemu:

Ai i Bi jesu vrednosti konstante za odsečak i konstante za nagib regresione prave dobijene regresionom analizom vrednosti ln ki u funkciji recipročnih vrednosti za apsolutnu temperaturu izraženih u Kelvinima (T).

Preko Arheniusove jednačine koja izražava vezu između konstanti za hidrolizu u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini, mogu se izračunati vrednosti konstante kinetike pseudo-prvog reda, a samim tim i vrednosti poluživota za različite temperature za koje nije moguće direktno eksperimentalno određivanje konstanti.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Većina reakcija hidrolize odigrava se po kinetici prvog reda, te je vreme poluživota nezavisno od koncentracije (videti jednačinu 4 u Delu drugom ove metode). Ovo dozvoljava ekstrapolaciju rezultata dobijenih u laboratorijskim eksperimentima određenih za koncentracije od 10-2M do 10-3 M na uslove u životnoj sredini (≤ 10-6).

Primere dobre korelacije između stepena hidrolize izmerenih u ispitivanjima u čistoj i u ambijentalnoj vodi za set hemikalije, uz uslov da se mere pH vrednost i temperatura, dali su Mabej i Mil**1**.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1. ispitivanoj supstanci:

- uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (sa naznačenom pozicijom molekula koji je obeležen radioizotopom) i relevantna fizička i hemijska svojstva (videti odeljak 1.5. ove metode);

- stepen čistoće supstance;

- stepen čistoće oznake i označene supstance, kao i molarna aktivnost (gde je prikladno);

- puferski rastvori;

- vreme i način pripreme;

- puferski rastvori i voda koji se koriste u ispitivanju;

- molarna koncentracija i pH vrednosti puferskih rastvora;

2. uslovima ispitivanja:

- datum izvođenja ispitivanja;

- količina ispitivane supstance;

- način uvođenja ispitivane supstance u rastvor pufera i vrsta rastvarača (kao i količina);

- zapremina puferskih rastvora koji se inkubiraju (puferski rastvor u koji je rastvorena ispitivana supstanca);

- opis sistema za inkubaciju;

- pH vrednost i temperatura;

- vreme uzimanja uzoraka za analizu;

- način ekstrakcije;

- metode za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivane supstance i produkata hidrolize u puferskim rastvorima;

- broj ponavljanja;

3. Rezultatima:

- ponovljivost i osetljivost primenjenih analitičkih metoda;

- efikasnost (kriterijumi za validnost ispitivanja dati su u odeljku 1.7.1. ove metode);

- podaci za pojedinačna ponavljanja i njihove srednje vrednosti izraženi u tabelama;

- maseni balans u toku i na kraju ispitivanja (kad se koriste obeležene supstance);

- rezultati preliminarnog ispitivanja;

- tumačenje rezultata;

- svi originalni (sirovi) podaci i grafici.

Kada je određen stepen hidrolize u izveštaju o ispitivanju navode se:

- grafički prikaz koncentracija ispitivane supstance u funkciji vremena, kada je moguće i za produkte hidrolize za svaku pH vrednost i temperaturu;

- rezultati Arhenijusove jednačine za temperaturu 20° C/25° C sa pH vrednostima, konstante (x-1 ili dan-1), vreme poluživota ili DT50, temperature (°C) uključujući i intervale poverenja i koeficijente korelacije (p2);

- predloženi put hidrolize.

**4. LITERATURA**

1. OECD, (1981) Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 111, adopted 12 May 1981.

2. US-Environmental Protection Agency, (1982) 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 oC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3. Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4. European Union (EU), (1995) Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC Concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

5. Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6. BBA, (1980) Merkblatt No 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7. SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and ECotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8. OECD, (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

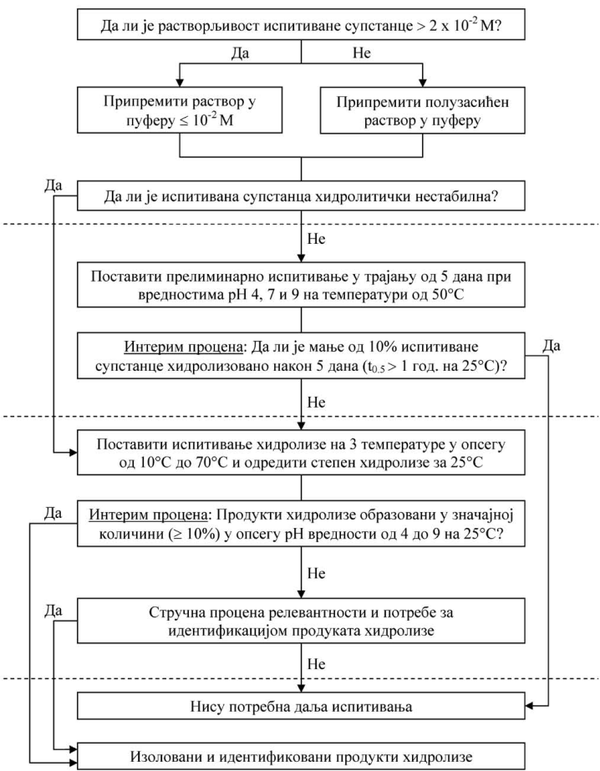
9. OECD, (1993) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P., (1997) ReCommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to Computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental ToxiCology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11. Mabey, W. and Mill, T., (1978) Critical review of hydrolysis of organic Compounds in water under environmental Conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, p. 383-415.

**Deo drugi**

**ŠEMA ETAPNOG ISPITIVANJA HIDROLIZE**



**Deo treći**

**PUFERSKI SISTEMI**

Puferske smeše prema Klarku i Lubsu:

|  |  |
| --- | --- |
| Sastav | pH**VI** |
| 0,2 N HCl and 0,2 N KCl na 20°C | |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti od 100 ml | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 1,8 |
| 5,3 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml | 2,2 |
| 0,1 M kalijum biftalat + 0,1 N HCl na 20° C | |
| 46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 2,2 |
| 39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 2,4 |
| 32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 2,6 |
| 26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 2,8 |
| 20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 3,0 |
| 14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 3,2 |
| 9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 3,4 |
| 5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 3,6 |
| 2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 3,8 |
| 0,1 M kalijum biftalat + 0,1 N NaOH na 20° C | |
| 0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 4,2 |
| 7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 4,4 |
| 12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 4,6 |
| 17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 4,8 |
| 23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml | 6,0 |
| 0,1 M monokalijum fosfat + 0,1 N NaOH na 20°C | |
| 5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 6,0 |
| 8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 6,2 |
| 12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 6,4 |
| 17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 6,6 |
| 23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 7,2 |
| 39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 7,4 |
| 42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 7,6 |
| 45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 7,8 |
| 46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml | 8,0 |
| 0,1 M H3BO3 u 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH na 20°C | |
| 2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 7,8 |
| 3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 8,0 |
| 5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 8,2 |
| 8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 8,4 |
| 12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 8,6 |
| 16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 9,2 |
| 32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 9,4 |
| 36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 9,6 |
| 40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 9,8 |
| 43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml | 10,0 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**VI** Vrednosti pH date u ovoj tabeli izračunate su Sorensenovim standarnim jednačinama (1909). Odgovarajuće pH vrednosti su za 0,04 pH jedinica veće od vrednosti datih u tabeli.

Citratni puferi prema Kolthofu i Vlišhoveru:

|  |  |
| --- | --- |
| Sastav | pH |
| 0,1 M monokalijum citrat i 0,1 N HCl na 18°C (\*) | |
| 49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 2,2 |
| 43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 2,4 |
| 36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 2,6 |
| 30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 2,8 |
| 23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 3,0 |
| 17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 3,2 |
| 10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 3,4 |
| 4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 3,6 |
| 0,1 M monokalijum citrat i 0,1 N NaOH na 18°C**VII** | |
| 2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 4,2 |
| 23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 4,4 |
| 31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 4,6 |
| 39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 4,8 |
| 46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 5,0 |
| 54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 5,2 |
| 61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 5,4 |
| 68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 5,6 |
| 74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 5,8 |
| 81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml | 6,0 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**VII** Dodati mali kristal tinola ili slične supstance da se spreči rast plesni.

Boratne smeše prema Sorensenu:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sastav | | Sorensen,  pH na 18°C | Valbum, pH na | | |
| boraks (ml) | HCl/NaOH (ml) | 10°C | 40°C | 70°C |
| 0,05 M boraks + 0,1 N HCl | | | | | |
| 5,25 | 4,75 | 7,62 | 7,64 | 7,55 | 7,47 |
| 5,50 | 4,50 | 7,94 | 7,98 | 7,86 | 7,76 |
| 5,75 | 4,25 | 8,14 | 8,17 | 8,06 | 7,95 |
| 6,00 | 4,00 | 8,29 | 8,32 | 8,19 | 8,08 |
| 6,50 | 3,50 | 8,51 | 8,54 | 8,40 | 8,28 |
| 7,00 | 3,00 | 8,08 | 8,72 | 8,56. | 8,40 |
| 7,50 | 2,50 | 8,80 | 8,84 | 8,67 | 8,50 |
| 8,00 | 2,00 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| 8,50 | 1,50 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| 9,00 | 1,00 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| 9,50 | 0,50 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| 10,00 | 0,00 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 0,05 M boraks + 0,1 N NaOH | | | | | |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 9,0 | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| 8,0 | 2,0 | 9,5 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| 7,0 | 3,0 | 9,68 | 9.76 | 9,44 | 9,12 |
| 6,0 | 4,0 | 9,97 | 10,06 | 9,67 | 9,28 |

Fosfatne smeše prema Sorensenu:

|  |  |
| --- | --- |
| Sastav | pH |
| 0,0667 M monokalijum fosfat + 0,0667 M dinatrijum fosfat na 20°C | |
| 99,2 ml KH2PO4 + 0,8 ml Na2HPO4 | 5,0 |
| 98,4 ml KH2PO4 + 1,6 ml Na2HPO4 | 5,2 |
| 97,3 ml KH2PO4 + 2,7 ml Na2HPO4 | 5,4 |
| 95,5 ml KH2PO4 + 4,5 ml Na2HPO4 | 5,6 |
| 92,8 ml KH2PO4 + 7,2 ml Na2HPO4 | 5,8 |
| 88,9 ml KH2PO4 + 11,1 ml Na2HPO4 | 6,0 |
| 83,0 ml KH2PO4 + 17,0 ml Na2HPO4 | 6,2 |
| 75,4 ml KH2PO4 + 24,6 ml Na2HPO4 | 6,4 |
| 65,3 ml KH2PO4 + 34,7 ml Na2HPO4 | 6,6 |
| 53,4 ml KH2PO4 + 46,6 ml Na2HPO4 | 6,8 |
| 41,3 ml KH2PO4 + 58,7 ml Na2HPO4 | 7,0 |
| 29,6 ml KH2PO4 + 70,4 ml Na2HPO4 | 7,2 |
| 19,7 ml KH2PO4 + 80,3 ml Na2HPO4 | 7,4 |
| 12,8 ml KH2PO4 + 87,2 ml Na2HPO4 | 7,6 |
| 7,4 ml KH2PO4 + 92,6 ml Na2HPO4 | 7,8 |
| 3,7 ml KH2PO4 + 96,3 ml Na2HPO4 | 8,0 |

**C.8. TOKSIČNOST ZA KIŠNE GLISTE: METODA ISPITIVANJA SA VEŠTAČKIM ZEMLJIŠTEM**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

U ovoj laboratorijskoj metodi ispitivanja, ispitivana supstanca dodaje se u veštačko zemljište u koje se smeštaju kišne gliste. Nakon 14 dana (ili po izboru nakon 7 dana) ispituje se letalno dejstvo supstance na kišne gliste. Ovo ispitivanje predstavlja postupak kojim se u relativno kratkom roku može steći uvid u dejstvo hemikalija na kišne gliste, kod dermalnog i oralnog unosa supstance.

*1.2. DEFINICIJA*

LC50 jeste koncentracija supstance koja izaziva smrt 50% ispitivanih jedinki u toku unapred utvrđenog perioda izlaganja.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentna supstanca se koristi povremeno kao sredstvo kojim se pokazuje da nije došlo do značajnih promena osetljivosti test sistema.

Kao referentna supstanca preporučuje se hloracetamid analitičke čistoće.

*1.4. PRINCIP METODE*

Zemljište je promenljiv medijum, te se za ovu metodu koristi precizno definisano veštačko zemljište koje sadrži ilovaču. Odrasle jedinke kišnih glista vrste *Eisenia foetida* (videti belešku u Delu drugom ove metode) drže se u definisanom veštačkom zemljištu tretiranom različitim koncentracijama ispitivane supstance. Četrnaest dana (može i 7 dana) nakon početka ispitivanja, sadržaj posude iz svake esperimentalne grupe istrese se u plitku laboratorijsku kadicu i prebroje se preživele kišne gliste.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Metoda je osmišljena tako da je maksimalno ponovljiva, s obzirom na zemljišni supstrat i ispitivane organizme. Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, smrtnost u kontrolama ne sme premašiti 10% na kraju ispitivanja.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Materijal**

*1.6.1.1. Zemljišni supstrat*

Kao osnovni ispitivani supstrat koristi se tačno definisano veštačko zemljište.

Osnovni supstrat (procenti na bazi suve mase) sadrži:

- 10% treseta (vrednosti pH što je moguće bliže 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, sitno mleven);

- 20% kaolinska glina sa, ako je moguće, više od 50% kaolina;

- oko 69% industrijskog kvarcnog peska (pretežno sitni pesak sa više od 50% čestica veličine 0,05 mm do 0,2 mm). Ako se supstanca ne može dovoljno dobro dispergovati u vodi, ostaviti 10 g po sanduku da bi se kasnije pomešalo sa ispitivanom supstancom;

- oko 1% kalcijum karbonata (CaCO3), sprašenog, hemijski čistog, dodaje se za korekciju pH vrednosti na 6,0 ± 0,5.

Ispitivani supstrat sadrži:

- osnovni supstrat,

- ispitivanu supstancu i

- dejonizovanu vodu.

Sadržaj vode iznosi oko 25% do 42% suve mase osnovnog supstrata. Sadržaj vode u supstratu određuje se sušenjem uzorka do stalne težine na temperaturi od 105° C. Ključni kriterijum je da veštačko zemljište bude ovlaženo do tačke u kojoj nema zadržavanja vode. Tokom mešanja se pazi da se dobije ravnomerna raspodela ispitivane supstance i supstrata. Opisuje se način na koji se ispitivana supstanca dodaje u supstrat.

Kontrolni supstrat sadrži:

- osnovni supstrat i

- vodu.

Ako se koristi aditiv, dodatna kontrola sadrži istu količinu aditiva.

*1.6.1.2. Eksperimentalne posude*

Staklena posuda zapremine oko 1 L (propisno pokrivena plastičnim poklopcem, sahatnim staklom ili plastičnom folijom sa otvorima za ventilaciju) napunjena ispitivanim i kontrolnim supstratom u količini ekvivalentnoj 500 g suve mase supstrata.

**1.6.2. Uslovi u toku ispitivanja**

Eksperimentalne posude držati u klima komorama na temperaturi od 20° C ± 2° C sa stalnim osvetljenjem. Intenzitet svetla da bude između 400 lux i 800 lux.

Ispitivanje traje 14 dana, ali se smrtnost procenjuje i 7 dana nakon početka ispitivanja.

**1.6.3. Postupak metode ispitivanja**

Ispitivane koncentracije

Koncentracije ispitivane supstance izražavaju se kao masa supstance po suvoj masi supstrata (mg/kg).

Preliminarna studije za utvrđivanje opsega koncentracija

Opseg koncentracija koje dovode do smrtnosti od 0% do 100% može se odrediti studijom za utvrđivanje opsega da bi se dobila informacija o opsegu koncentracija koje će se koristiti u definitivnom ispitivanju.

Supstanca se ispituje u sledećim koncentracijama: 1.000 mg; 100 mg; 10 mg; 1 mg i 0,1 mg supstance po kilogramu supstrata (suva masa).

Ako se radi konačno ispitivanje, po jedna ispitivana grupa od po 10 glista po koncentraciji i jedna grupa po kontroli, mogu biti dovoljne za studiju utvrđivanja opsega koncentracija.

Konačno ispitivanje

Rezultati studije za utvrđivanje opsega koncentracija koriste se za izbor najmanje 5 koncentracija u geometrijskom nizu sa faktorom ne većim od 1,8. Izabrane koncentracije obuhvataju opseg smrtnosti od 0% do 100%.

Ispitivanje serija koncentracija treba da omogući što precizniju procenu vrednosti LC50 i odgovarajućih intervala poverenja.

U definitivnom ispitivanju koriste se najmanje četiri ekperimentalne grupe od po 10 glista po koncentraciji i kontroli. Rezultati tretmana prikazuju se kao srednja vrednost iz 4 grupe sa standardnom devijacijom.

Kad dve uzastopne koncentracije, pri faktoru od 1,8 rezultiraju 0% i 100% smrtnošću, te dve vrednosti su dovoljne da pokažu opseg u kojem se nalazi LC50.

Mešavina osnovnog ispitivanog supstrata i ispitivane supstance

Ispitivani supstrat kad god je moguće priprema se izuzimajući vodu, bez i jednog dodatnog agensa. Neposredno pre početka ispitivanja, emulzija ili disperzija ispitivane supstance u dejoniziovanoj vodi ili drugom rastvaraču meša se sa osnovnim ispitivanim supstratom ili se ravnomerno rasprši po supstratu pomoću hromatografskog ili sličnog raspršivača za fino raspršivanje.

Ako nije rastvorljiva u vodi, ispitivana supstanca može se rastvoriti u najmanjoj mogućoj zapremini odgovarajućeg organskog rastvarača (npr. heksana, acetona ili hloroforma). Samo sredstva koja brzo isparavaju mogu se koristiti za rastvaranje, disperziju ili emulgovanje ispitivane supstance. Ispitivana supstanca se pre upotrebe provetrava. Količina vode koja ispari nadoknađuje se. Kontrola sadrži istu količinu svakog upotrebljenog dodatnog sredstva.

Ako ispitivana supstanca nije rastvorljiva ili se ne može dispergovati ili emulgovati u organskim rastvaračima, 10 g mešavine sitno samlevenog kvarcnog peska i količina ispitivane supstance potrebna za tretman 500 g suve mase veštačkog zemljišta pomeša se sa 490 g suve mase ispitivane supstance.

U svakoj grupi, u svaku posudu stavlja se vlažan ispitivani supstrat u količini ekvivalentnoj 500 g suve mase, a zatim se na površinu supstrata stavlja po 10 kišnih glista po posudi. Gliste su prethodno aklimatizovane u toku 24 sata u slično vlažnom, osnovnom suptratu, a zatim brzo isprane. Pre stavljanja u ispitivani supstrat, suvišna voda sa glista upije se filter papirom.

Eksperimentalne posude pokriju se perforiranim plastičnim poklopcima, sahatnim staklom ili folijom, da bi se sprečilo sušenje supstrata. Posude se drže 14 dana u uslovima propisanim metodom.

Smrtnost se procenjuje 14 (opciono 7) dana nakon početka. Supstrat se prospe u plitak stakleni sud od nerđajućeg čelika. Kišne gliste se pregledaju i odredi se broj preživelih glista. Kišne gliste smatraju se mrtvim ako ne odgovaraju na nežan mehanički nadražaj na prednjem kraju.

Kada se smrtnost procenjuje nakon 7 dana, posuda se ponovno napuni supstratom i preživele gliste se vrate na površinu istog ispitivanog supstrata.

**1.6.4. Ispitivani organizmi**

Ispitivani organizmi su odrasle jedinke *Eisenia foetida* (videti Deo drugi ove metode), stare najmanje dva meseca sa klitelumom, pune težine između 300 mg i 600 mg (za postupak uzgajanja videti Deo drugi ove metode).

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA I PROCENA REZULTATA*

Koncentracija ispitivane supstance navodi se u odnosu na odgovarajuće procente mrtvih kišnih glista.

Kad su podaci dobri, vrednost LC50 sa intervalima poverenja (p = 0,05) može se odrediti pomoću standardnih metoda (videti u literaturi**4**). LC50 se izražava u mg ispitivane supstance po kilogramu ispitivanog supstrata (suva masa).

U slučajevima kada je nagib krive dozne zavisnosti previše strm da bi se mogla izračunati LC50, dovoljna je grafička procena te vrednosti.

Kad dve uzastopne koncentracije pri faktoru od 1,8 dovode samo do 0% i 100% smrtnosti, te dve vrednosti su dovoljne da pokažu opseg u kojem se nalazi LC50.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži:

- izjavu da je ispitivanje izvedeno u skladu sa navedenim kriterijima kvaliteta;

- podatak koje je ispitivanje izvedeno (preliminarna studija za utvrđivanje opsega koncentracija ili definitivno ispitivanje);

- tačan opis uslova u toku ispitivanja ili izjavu da je ispitivanje bilo izvedeno u skladu sa postupkom (navodi se svako odstupanje);

- tačan opis načina na koji je ispitivana supstanca umešana u osnovni supstrat;

- podatke o ispitivanim organizmima (vrsta, starost, srednja vrednost i opseg težine, uslovi držanja i uzgajanja, snabdevač);

- podatak o metodi korišćenoj za određivanje LC50;

- rezultate ispitivanja, uključujući sve upotrebljene podatke;

- opis primećenih simptoma ili promena u ponašanju ispitivanih organizama;

- smrtnost u kontrolama;

- LC50 ili najvišu ispitivanu koncentraciju bez smrtnosti i najnižu ispitivanu koncentraciju sa smrtnošću od 100%, 14 dana (i po izboru 7 dana) od početka ispitivanja;

- grafički prikaz krive koncentracija/odgovor;

- rezultate dobijene sa referentnom supstancom (u vezi sa ovim ispitivanjem ili iz prethodnih ispitivanja kontrole kvaliteta).

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

3. Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, ECOlogie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.

4. Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

5. Commission of the European Communities, Development of a standardised laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6. Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für land - und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden', in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

**Deo drugi**

**UZGAJANJE I ČUVANJE GLISTA PRE ISPITIVANJA**

Za uzgajanje životinja, 30 do 50 odraslih glista stavi se u sanduk za uzgajanje sa svežim supstratom iz koga se izvade nakon 14 dana. Gliste se mogu upotrebiti za uzgajanje daljih odgajivačkih grupa. Kišne gliste koje se izlegu iz kokona koriste se u ispitivanjima kad odrastu (u prepisanim uslovima nakon dva do tri meseca).

USLOVI DRŽANJA I UZGOJA

Uslovi za držanje i uzgoj životinja su:

Klima komora: temperatura 20° C ± 2° C, ako je moguće sa stalnim osvetljenjem (intenziteta 400 lux do 800 lux).

Sanduci za uzgoj: pogodni plitki sanduci zapremine od 10 L do 20 L.

Supstrat: *Eisenia foetida* može se uzgajati u ekskrementu različitih životinja. Kao supstrat se preporučuje mešavina treseta (50% zapremine) i kravlje ili konjske balege (50% zapremine). Supstrat ima vrednost pH oko 6 do 7 (reguliše se kalcijum karbonatom) i nisku jonsku provodljivost (manje od 6 mmhos ili 0,5% koncentracije soli). Supstrat treba da bude vlažan, ali ne previše mokar.

Uz opisani postupak mogu se uspešno koristiti i druge procedure.

Napomena: Postoje dva tipa glista *Eisenia foetida* koje su taksonomi razdvojili u dve vrste (Vouche, 1972). Morfološki su slične, ali jedna vrsta (*Eisenia foetidafoetida*) ima na segmentima tipične poprečne pruge ili prstenove, dok ih druga vrsta (*Eisenia foetida andrei*) nema, odnosno ima crvenkaste šare. Kad god je moguće, koristiti vrsti *Eisenia foetida andrei*. Ostale vrste mogu se koristiti ako je na raspolaganju potrebna metodologija.

**C.9. BIORAZGRADNJA - ZAHN-WELLENS METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Cilj ove metode je procena mogućnosti potpune biorazgradljivosti dobro rastvorljivih, neisparljivih organskih supstanci na koje deluju mikroorganizmi u relativno visokim koncentracijama u ispitivanju u statičkim uslovima.

Prilikom tumačenja rezultata uzeti u obzir mogućnost fizičko-hemijske adsorpcije na suspendovane materije (videti odeljak 3.2. ove metode).

Za koncentracije ispitivane supstance uzimaju se koncentracije koje korespondiraju vrednostima za koncentraciju rastvorenog organskog ugljenika (u daljem tekstu: DOC) u opsegu od 50 mg/l do 400 mg/l ili vrednostima za hemijsku potrošnju kiseonika(u daljem tekstu: HPK) u opsegu od 100 mg/ldo 1.000 mg/l. Ispitivanje ovako relativno visokih koncentracija povećava analitičku pouzdanost. Jedinjenja sa toksičnim svojstvima mogu usporiti i inhibirati proces razgradnje.

U ovoj metodi, DOC ili HPK koristi se za procenu potpune biorazgradljivosti ispitivane supstance.

Uporedno izvođenje specifičnih analitičkih metoda može dati procenu primarne biorazgradljivosti supstanci (nestanak polazne supstance).

Metoda se može primeniti samo za organske supstance koje, pri koncentracijama koje se koriste u ispitivanju:

- jesu rastvorljive u vodi u uslovima definisanim ovom metodom;

- imaju neznatan napon pare u uslovima definisanim ovom metodom;

- ne deluju inhibitorno na bakterije;

- koje se adsorbuju se unutar sistema samo u ograničenoj meri;

- ne obrazuju penu.

Podaci o proporcionalnom udelu glavnih sastojaka ispitivane supstance korisni su pri tumačenju dobijenih rezultata, naročito u slučajevima gde su vrednosti dobijenih rezultata niske ili ekstremne.

Podaci o toksičnosti ispitivane supstance na mikroorganizme poželjni su za tumačenje niskih dobijenih vrednosti i prilikom izbora odgovarajućih koncentracija za potrebe ispitivanja.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Stepen razgradnje koji se dostigne na kraju ispitivanja opisuje se kao biorazgradljivost u Zahn-Wellens ispitivanju:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dt = |  | 1 - | CT - CB |  | x100 |
| CA - CBA |

pri čemu:

Dt jeste procenat biorazgradnje (%) u vremenu T;

CA jeste DOC (ili HPK) vrednost izmerena u ispitivanoj smeši 3 sata nakon početka ispitivanja (mg/l);

Ct jesu DOC ili HPK vrednosti izmerene u ispitivanoj smeši u vremenu t (mg/l);

CB jesu DOC ili HPK vrednosti izmerene u kontroli u vremenu t (mg/l);

CBA jesu DOC ili HPK vrednosti izmerene u kontroli, tri sata nakon početka ispitivanja (mg/l).

Stepen razgradnje izražava se u procentima bez decimala.

Procenat razgradnje jeste procenat smanjenja vrednosti DOC (ili HPK) za datu supstancu.

Razlika između vrednosti izmerene nakon tri sata i izračunate vrednosti, ili ako je moguće izmerene početne vrednosti, može dati koristan podatak o eliminaciji supstance (videti odeljak 3.2. ove metode).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Korišćenje referentnih supstanci može biti od koristi kada se ispituju nove supstance. Još uvek se ne mogu preporučiti određene referentne supstance.

*1.4. PRINCIP METODE*

Aktivni mulj, neorganski nutrijenti i ispitivana supstanca u vodenom rastvoru kao jedini izvor ugljenika sjedinjuju se, stavljaju u staklenu posudu zapremine jedan do četiri litra sa mešalicom i aeratorom. Ova smeša se meša i aeriše na temperaturi od 20° C do 25° C pod difuznim osvetljenjem ili u mračnoj komori u toku 28 dana. Proces razgradnje prati se određivanjem vrednosti DOC (ili HPK) u filtratu smeše sa jednodnevnom ili odgovarajućom redovnom dinamikom. Odnos vrednosti DOC (ili HPK) izmerene nakon svakog vremenskog intervala i vrednosti DOC (ili HPK) izmerene tri sata nakon početka ispitivanja izražava se kao procenat biorazgradnje i služi kao mera stepena razgradnje u datom vremenu. Ova vrednost se grafički prikazuje u funkciji vremena kako bi se dobila kriva biološke razgradnje.

Kad se koristi specifična analitička metoda, mogu se meriti promene u koncentraciji polazne supstance do kojih dolazi usled biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost metode ispitivanja je dokazana interkalibracijskim ispitivanjima.

Osetljivost metode je u velikoj meri određena varijabilnošću rezultata slepe probe i u manjoj meri, preciznošću određivanja koncentracije rastvorenog organskog ugljenika i količini rastvorene ispitivane supstance

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Pripreme**

*1.6.1.1. Reagensi*

Voda: voda za piće sa sadržajem organskog ugljenika < 5 mg/l. Zbirna koncentracija jona kalcijuma i magnezijuma ne sme biti veća od 2,7 mmol/l; u suprotnom, potrebno je napraviti odgovarajuće razblaživanje sa dejonizivanom ili destilovanom vodom.

Sumporna kiselina, analitičke čistoće: 50 g/l.

Rastvor natrijum-hidroksida, analitičke čistoće: 40 g/l.

Rastvor neorganskih nutrijenata (rastvoriti u 1 L dejonizovane vode):

- NH4Cl (amonijum-hlorid), analitičke čistoće: 38,5 g;

- NaH2PO4Í2H2O (natrijum dihidrogenfosfat), analitičke čistoće: 33,4 g;

- KH2PO4 (kalijum-hidrogenfosfat), analitičke čistoće: 8,5 g;

- K2HPO4 (dikalijum-hidrogenfosfat), analitičke čistoće: 21,75 g.

Smeša služi kao rastvor nutrijenata i kao puferski rastvor.

*1.6.1.2. Oprema*

Oprema za ispitivanje sadrži:

- staklene posude zapremine od 1 L do 4 L (npr. cilindrične posude);

- mešalicu sa staklenom ili metalnom lopaticom na odgovarajućoj osovini (lopatica se rotira na 5 cm do 10 cm iznad dna posude). Koristi se i magnetna mešalica sa magnetom za mešanje 7 cm do 10 cm;

- staklenu cevčicu sa unutrašnjim prečnikom 2 mm do 4 mm za aeraciju. Otvor cevčice da bude postavljen na oko 1 cm iznad dna posude;

- centrifugu (oko 3.550 g);

- pH-metar;

- oksimetar;

- filter papir;

- uređaj za membransku filtraciju;

- membranske filtere, promera pora 0,45 mm. Membranski filteri su pogodni ukoliko je onemogućeno oslobađanje ugljenika iz filter papira ili adsorbovanje ispitivane supstance u toku filtracije;

- analitičku opremu za određivanje sadržaja organskog ugljenika i hemijske potrošnje kiseonika.

*1.6.1.3. Priprema inokuluma*

Aktivni mulj iz postrojenja za biološku obradu ispira se (u više ponavljanja) centrifugiranjem ili taloženjem u vodi koja se koristi za potrebe ispitivanja.

Aktivni mulj je potrebno da bude u odgovarajućem stanju. Takav mulj se dobija iz postrojenja za obradu otpadnih voda koja ispravno rade. Da bi se dobilo što više različitih vrsta ili sojeva bakterija, poželjno je mešanje inokuluma iz različitih izvora (npr. iz različitih postrojenja za obradu, iz ekstrakata zemljišta, iz vode iz reka itd). Mešavina inokuluma dalje se tretira na navedeni način.

Za proveru aktivnosti aktivnog mulja videti odeljak "Funkcionalna kontrola" iz ove metode.

*1.6.1.4. Priprema ispitivanih rastvora*

U posudu dodati: 500 ml vode koja se koristi za potrebe ispitivanja, 2,5 ml/l rastvora neorganskih nutrijenata i aktivni mulj u količini koja korespondira 0,2 do 1,0 g suve materije/l u krajnjoj smeši. Dodati dovoljnu količinu osnovnog rastvora ispitivane supstance tako da se uspostavi vrednost DOC 50 mg/ldo 400 mg/l u krajnjoj smeši. Korespondirajuće vrednosti za HPK su 100 mg/l do 1.000 mg/l. Dopuniti posudu sa vodom koja se koristi za potrebe ispitivanja do zapremine 1 L ili 4 L (u zavisnosti od zapremine posude). Zapremina rastvora zavisi od broja uzoraka potrebnih za određivanje vrednosti DOC ili HPK, kao i zapremina uzoraka potrebnih za analitička merenja.

Zapremina od 2 L može se smatrati zadovoljavajućom. Za svaku koncentraciju ispitivane supstance paralelno se postavi minimum jedna kontrola, koja sadrži samo aktivni mulj i rastvor neorganskih nutrijenata u jednakoj zapremini vode kao u ostalim posudama.

**1.6.2. Izvođenje ispitivanja**

Rastvori ispitivane supstance mešaju se na magetnoj mešalici ili mešalici sa lopaticom pod difuznim osvetljenjem ili u mračnoj komori na temperaturi 20° C do 25° C. Aeracija se obavlja pomoću komprimovanog vazduha koji se prečišćava pomoću staklene vune i pomoću špric-boce ukoliko se ukaže potreba. Potrebno je onemogućiti taloženje mulja i pad koncentracija kiseonika ispod 2 mg/l.

Vrednost pH se proverava u jednakim vremenskim intervalima (npr. dnevno) i da se po potrebi podesi na pH vrednosti od 7 ili 8.

Gubici usled isparavanja nadoknađuju se dodavanjem potrebne količine dejonizovane ili destilovane vode neposredno pre svakog uzimanja uzoraka. Poželjno je pre početka ispitivanja označiti nivo tečnosti u posudi. Nove oznake nivoa tečnosti stavljaju se na posudu nakon svakog uzimanja uzoraka (bez aeracijskog suvog mešanja). Prvi uzorci se uvek uzimaju tri sata nakon početka ispitivanja da bi se odredilo da li se ispitivana supstanca adsorbuje na aktivni mulj.

Razgradnja ispitivane supstance prati se određivanjem vrednosti DOC koje se radi svakodnevno ili u određenim redovnim vremenskim intervalima. Uzorci iz eksperimentalnih posuda i kontrolnih posuda filtriraju se kroz pažljivo opran filter papir. Prvih 5 ml filtrata rastvora se odbacuje. Aktivni mulj koji je teško filtrirati može se prethodno ukloniti centrifugiranjem 10 minuta. Određivanje vrednosti DOC ili HPK radi se najmanje u dva ponavljanja. Ispitivanje se izvodi u trajanju do 28 dana.

Napomena: Filtrati koji ostaju zamućeni dalje se filtriraju kroz membranske filtere. Membranski filteri ne smeju otpuštati ili adsorbovati nijednu vrstu organskog materijala.

Kontrola aktivnog mulja

Uporedo sa svakom serijom koncentracija ispitivane supstance postavlja se paralelno ispitivanje da bi se proverila aktivnost aktivnog mulja. Za ovu namenu se dietilenglikol pokazao korisnim.

Adaptacija

Ukoliko se merenja obavljaju u relativno kratkim intervalima (npr. svakodnevno), adaptiranost se može jasno uočiti iz krive razgradnje (videti Sliku 2). Ispitivanje ne treba započeti neposredno pred vikend.

Ako adaptiranost nastupi na kraju perioda, ispitivanje se može produžiti sve dok se ne završi razgradnja.

Napomena: Ako je potrebno znati više o ponašanju adaptiranog mulja, isti aktivni mulj se još jednom tretira istom ispitivanom supstancom u skladu sa postupkom:

Isključiti mešalicu i aerator i ostaviti da se aktivni mulj istaloži. Odstraniti supernatant, napuniti posudu do 2 L zapremine sa vodom, mešati 15 minuta i ponovno ostaviti mulj da se istaloži. Nakon što se supernatant ponovno odstrani, istaloženi mulj se ponovo tretira istom ispitivanom supstancom u skladu sa odeljcima 1.6.1.4. i 1.6.2. ove metode. Aktivni mulj se može istaložiti i centrifugiranjem.

Adaptirani mulj može da se meša sa svežim muljem do koncentracije 0,2 g do 1 g suve težine/l.

Oprema za analitička merenja

Uzorci se filtriraju kroz pažljivo oprani filter papir (za pranje se koristi dejonizovana voda).

Filtrati koji ostaju zamućeni filtriraju se kroz membranske filtere promera 0,45 μm.

Vrednost DOC određuje se u dva ponavljanja u filtratima uzoraka (prvih 5 ml se odbacuje) pomoću TOC instrumenta. Ako se filtrat ne može analizirati istog dana, čuvati ga u frižideru do sledećeg dana. Ne preporučuje se čuvanje materijala duže vreme.

HPK se određuje u filtratima uzorka prema postupku opisanom u literaturi**2**.

**2. PODACI I PROCENA**

Vrednost DOC, odnosno HPK se određuje najmanje u dva ponavljanja u uzorcima u skladu sa smernicama datim u odeljku 1.6.2. Razgradnja u vremenu t izračunava se prema formuli (sa definicijama) datim u odeljku 1.2.

Stepen razgradnje koji se dostigne na kraju ispitivanja se opisuje kao "biorazgradljivost u Zahn-Wellens ispitivanju".

Napomena: Ako se potpuna razgradnja dostigne pre kraja ispitivanja i ako se ovaj rezultat potvrdi i u drugom navratu narednog dana, ispitivanje se može prekinuti.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži:

- početnu koncentraciju ispitivane supstance;

- sve ostale podatke i rezultate ispitivanja supstance, referentne supstance (ukoliko je korišćena) i slepe probe;

- koncentraciju ispitivane supstance nakon tri sata;

- biorazgradnju (kriva sa opisom);

- datum i mesto gde su uzeti organizmi koji su korišćeni u ispitivanju, nivo adaptiranosti aktivnog mulja, korišćene koncentracije, itd;

- naučno utemeljene razloge za eventualne promene u izvođenju ispitivanja.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Postepeno smanjenje vrednosti DOC (HPK) koje se registruje u toku nekoliko dana ili sedmica jeste pokazatelj da je ispitivana supstanca biorazgradljiva.

Na ispitivanje može da utiče fizičko-hemijska adsorpcija. To je slučaj kada se u toku prva tri sata ispitivanja, registruje potpuno ili delimično smanjenje vrednosti DOC (HPK), a razlika u nivou tečnosti između ispitivane grupe i kontrolne grupe ostaje neznatna.

Potrebno je izvesti dodatna ispitivanja za razgraničavanje procesa biorazgradnje (ili parcijalne biorazgradnje) od procesa adsorpcije. Najpouzdaniji način da se to uradi je da se u postavci ispitivanja (najbolje respirometrijsko ispitivanje), kao inokulum upotrebe supernatant ili mulj.

Supstance su potencijalno biorazgradljive, ako se u ispitivanju registruje značajno smanjenje vrednosti DOC (HPK) koje nije posledica adsorpcije. Delimično smanjenje vrednosti DOC (HPK), koje nije posledica adsorpcije, ukazuje na to da je ispitivana supstanca biorazgradljiva u određenoj meri. Neznatno ili nulta vrednost smanjenja DOC (HPK) može biti posledica inhibitornog delovanja ispitivane supstance na mikroorganizme, što se primećuje po zamućenju supernatanta. U tom slučaju ispitivanje ponoviti sa nižim koncentracijama ispitivane supstance.

Precizniji rezultati dobijaju se upotrebom najpodesnije analitičke metode. Kada se u ispitivanju koristi obeležavanje izotopom C14, obrazovanje C14O2 potvrđuje da je došlo do biorazgradnje ispitivane supstance.

Kad su rezultati prikazani u smislu primarne biorazgradnje, ako je moguće, objasniti promenu hemijske strukture koja uzrokuje smanjenje količine polazne supstance.

Potvrda analitičke metode prikazuje se zajedno sa odgovorom dobijenim sa slepom probom (samo medijum, bez aktivnog mulja).

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the COuncil C(81) 30 final.

2. Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, COmmission Directive 84/449/EEC, (OJ L 251,19.9.1984, p. 1).

**Deo drugi**

**PRIMER PROCENE**

Organsko jedinjenje: 4-etoksibenzoeva kiselina

Teorijska koncentracija: 600 mg/l

Teorijska DOC vrednost: 390 mg/l

Inokulum postrojenje za obradu otpadne vode iz domaćinstava

Koncentracija: 1 g/l suve materije

Adaptiranost: nije adaptiran

Ispitivanje: određivanje DOC vrednosti

Količina uzorka: 3 ml

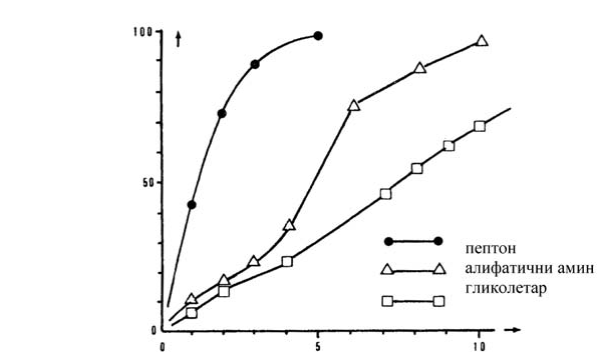
Kontrolna supstanca: dietilenglikol

Toksičnost jedinjenja: Nema toksičnog efekta u koncentraciji ispod 1.000 mg/l

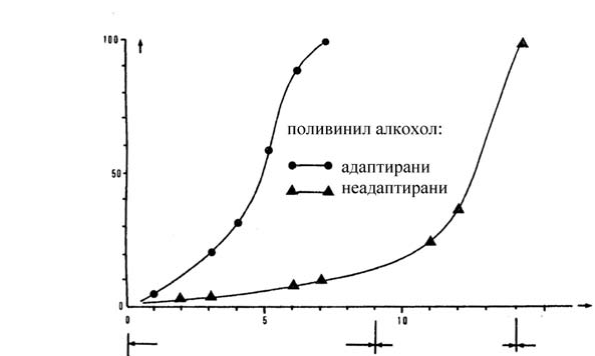
Primenjeno ispitivanje: test fermentacije

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Trajanje ispitivanja | Kontrolna supstanca | | | | Ispitivana supstanca | | |
| Slepa proba DOC (1) (mg/l) | DOC (1) (mg/l) | DOC neto (mg/l) | Razgradnja (%) | DOC (1) (mg/l) | DOC neto (mg/l) | Razgradnja (%) |
| 0 | - | - | 300,0 | - | - | 390,0 | - |
| 3 sata | 4,0 | 298,0 | 294,0 | 2 | 371,6 | 367,6 | 6 |
| 1 dan | 6,1 | 288,3 | 282,2 | 6 | 373,3 | 367,2 | 6 |
| 2 dana | 5,0 | 281,2 | 276,2 | 8 | 360,0 | 355,0 | 9 |
| 5 dana | 6,3 | 270,5 | 264,2 | 12 | 193,8 | 187,5 | 52 |
| 6 dana | 7,4 | 253,3 | 245,9 | 18 | 143,9 | 136,5 | 65 |
| 7 dana | 11,3 | 212,5 | 201,2 | 33 | 104,5 | 93,2 | 76 |
| 8 dana | 7,8 | 142,5 | 134,7 | 55 | 58,9 | 51,1 | 87 |
| 9 dana | 7,0 | 35,0 | 28,0 | 91 | 18,1 | 11,1 | 97 |
| 10 dana | 18,0 | 37,0 | 19,0 | 94 | 20,0 | 2,0 | 99 |
| (1) Srednja vrednost od tri merenja | | | | | | | |

Slika 1: Primer krive biorazgradnje



Slika 2: Primer adaptacije aktivnog mulja



**C.10. BIORAZGRADNJA - ISPITIVANJE SIMULACIJE AKTIVNOG MULJA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

**1.1.1. Opšte napomene**

Metoda se primenjuje samo na organske supstance u koncentracijama koje se koriste u ispitivanju:

- rastvorljive u vodi za pripremu rastvora;

- imaju neznatan napon pare u uslovima definisanim ovom metodom;

- ne deluju inhibitorno na bakterije.

Podaci o procentualnom udelu glavnih sastojaka ispitivane supstance korisni su za tumačenje dobijenih rezultata, posebno u slučajevima gde su vrednosti dobijenih rezultata niske ili ekstremne.

Poželjno je imati podatke o toksičnosti ispitivane supstance za tumačenje niskih dobijenih vrednosti i prilikom izbora odgovarajućih koncentracija za potrebe ispitivanja.

**1.1.2. Određivanje potpune biorazgradljivosti   
(DOC/HPK analiza)**

Cilj metode je određivanje potpune biološke razgradljivosti što je određeno uklanjanjem ispitivane supstance i njenih metabolita iz sistema koji simulira postrojenje sa aktivnim muljem, pri koncentraciji koja odgovara vrednosti > 12 mg DOC/l (ili približno 40 mg HPK/l). Optimalnom vrednošću smatra se 20 mg DOC/l (DOC jeste koncentracija rastvorenog organskog ugljenika, HPK jeste hemijska potrošnja kiseonika).

Potrebno je utvrditi sadržaj organskog ugljenika (ili HPK) ispitivanog materijala.

**1.1.3. Određivanje primarne biorazgradljivosti   
(specifična analiza)**

Cilj ove metode je određivanje primarne biorazgradljivosti ispitivane supstance u sistemu koji simulira postrojenje sa aktivnim muljem, pri koncentraciji ispitivane supstance od približno 20 mg/l, pomoću specifične analitičke metode (niža ili viša koncentracija ispitivane supstance može se koristiti ukoliko je moguće primeniti izabranu analitičku metodu i ukoliko ispitivana supstanca u datim koncentracijama ne ispoljava toksično dejstvo). Ova analiza omogućava procenu primarne biorazgradljivosti ispitivane supstance (nestanak polazne hemijske supstance).

Cilj metode nije određivanje mineralizacije ispitivane supstance.

Potrebno je da bude dostupna odgovarajuća analitička metoda za odabranu ispitivanu supstancu.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

**1.2.1. DOC/HPK analiza**

Stepen uklanjanja ispitivane supstance se izračunava formulom:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| DR = | T - (E - Eo) | x 100 % | (1(a)) |
| T |

pri čemu:

DR jeste stepen uklanjanja ispitivane supstance izražen u procentima DOC (ili HPK) nakon unapred određenog retencionog perioda;

T jeste koncentracija ispitivane supstance u influentu izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l);

E jeste koncentracija DOC (ili HPK) u efluentu izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l);

Eo jeste koncentracija DOC (ili HPK) u efluentu u kontroli izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l).

Razgradnja jeste procenat smanjenja DOC (ili HPK) ispitivane supstance nakon unapred određenog retencionog perioda

**1.2.2. Specifična analiza**

Procenat uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze (Rw) nakon unapred određenog vremena retencije izračunava se formulom:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Rw = | CI - Co) | x 100 % | (1(b)) |
| CI |

pri čemu:

CI jeste koncentracija ispitivane supstance u influentu sistema (izražena u mg/l, određeno specifičnom analizom);

Co jeste koncentracija ispitivane supstance u efluentu sistema (izražena u mg/l, određeno specifičnom analizom).

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance za ovu metodu ispitivanja nisu određene.

*1.4. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Za određivanje potpune biorazgradljivosti, uporedo se izvode dva ispitivanja u dva sistema (OECD potvrdno ispitivanje ili ispitivanje sa poroznim posudama). Ispitivana supstanca dodaje se influentu jednog sistema (sintetička otpadna voda ili komunalna otpadna voda), dok se u drugi sistem uvodi samo influent. Za određivanje primarne biorazgradnje specifičnom analizom u influentu i efluentu, koristi se samo jedan sistem.

DOC (ili HPK) koncentracije mere se u efluentu ili se koncentracija ispitivane supstance određuje specifičnim analizama.

DOC iz ispitivanog materijala se ne meri, već se samo navede.

Kad se određuju vrednosti DOC (ili HPK) smatra se da razlika između srednje vrednosti koncentracija u efluentu u kontroli i efluentu u tretmanu potiče od nerazgrađene ispitivane supstance

Kad se izvode specifične analize, meri se promena u koncentraciji polazne supstance (primarna biorazgradljivost).

Sistemi mogu da se postave kao sistemi spojenih jedinica, uz proceduru transinokulacije.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Početna koncentracija ispitivane supstance zavisi od vrste primenjene analize i njenih ograničenja.

*1.6. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.6.1. Priprema**

*1.6.1.1. Oprema*

Potrebno je raspolagati sa par sistema istog tipa, osim kad se izvode specifične analize. Koriste se dva tipa sistema:

OECD potvrdno ispitivanje

Oprema (videti Deo drugi ove metode) se sastoji od spremnika (A) za sintetičke otpadne vode, pumpe za doziranje (B), aeratora (C), separatora (D), pumpe za recirkulaciju aktivnog mulja (E) i kolektora za tretirani efluent (F).

Posude (A) i (F) su od stakla ili pogodnog plastičnog materijala, zapremine najmanje 24 L. Pumpa za doziranje (B) obezbeđuje stalan dotok sintetičkih otpadnih voda u aerator. Koristi se bilo koji pogodni sistem ako su obezbeđeni konstantan dotok i koncentracija. Tokom normalnog rada sistema otvor separatora (D) je pozicioniran tako da aerator primi zapreminu od 3 ispitivane smeše. Perforirani difuzer vazduha (G) je postavljen u aerator (C) na sredini konusnog dna. Količina vazduha koja se uduvava u aerator prati se pomoću merača protoka.

Pumpa za recirkulaciju aktivnog mulja (E) postavljena je tako da se aktivni mulj iz separatora neprekidno recirkuliše u posudu za aeraciju (C).

"Porozna posuda"

Porozna posuda je napravljena od ploča poroznog polietilena (2 mm debljine, maksimalni promer pore je 95 mm), koje su oblikovane u cilindre prečnika 14 cm sa konusnom bazom pod uglom od 45° (Deo drugi Slike 1 i 2). Porozna posuda nalazi se u nepropusnoj posudi od odgovarajuće plastike, prečnika 15 cm, sa otvorom na visini od 17,2 cm na cilindričnom delu, koji određuje zapreminu (3 L) u loncu. Čvrsti potporni prsten, napravljen od odgovarajuće plastike, postavljen je oko vrha unutrašnje posude, tako da između unutrašnje i spoljašnje posude postoji prostor od 0,5 cm.

Porozna posuda se može postaviti u vodeno kupatilo. U osnovi unutrašnje posude su postavljeni difuzeri koji obezbeđuju dotok vazduha.

Posude (A) i (E) su od stakla ili odgovarajuće plastike, zapremine najmanje 24 L. Pumpa za recirkulaciju aktivnog mulja (B) omogućava stalni tok sintetičke otpadne vode u aerator. Koristi se bilo koji pogodan sistem ako su obezbeđeni stalan dotok i koncentracija.

Treba imati rezervne unutrašnje porozne posude ukoliko u toku rada sistema dođe do zapušenja. Zapušene posude potapaju se u rastvor hipohlorita, a zatim se temeljno isperu vodom iz česme.

*1.6.1.2. Filtracija*

Koristi se oprema za membransku filtraciju i membranski filteri promera 0,45 mm. Vodi se računa da se ugljenik ne oslobađa iz membranskih filtera i da se ispitivana supstanca ne adsorbuje u toku filtracije.

*1.6.1.3. Otpadna voda*

Koristiti se pogodna sintetička ili komunalna otpadna voda.

Primer sintetičke otpadne vode

U jednom litru vode iz česme rastvori se:

- 160 mg peptona,

- 10 mg mesnog ekstrakta,

- 30 mg uree,

- 7 mg NaCl,

- 4 mg CaCl2×2H2O,

- 2 mg MgSO4×7H2O i

- 28 mg K2HPO4.

Komunalna otpadna voda

Uzima se otpadna voda koja se preliva iz primarnog taložnika iz postrojenja koja dominantno prerađuju komunalne otpadne vode.

*1.6.1.4. Osnovni rastvor ispitivane supstance*

Osnovni rastvor ispitivane supstance, npr. 1%, priprema se pre izvođenja ispitivanja. Koncentracija ispitivane supstance se definiše, kako bi se dodala odgovarajuća zapremina osnovnog rastvora u otpadnu vodu ili direktno u sistem.

*1.6.1.5. Inokulum*

Napomena: Kad se koristi komunalna otpadna voda, ne koristi se inokulum sa niskom koncentracijom bakterija, ali može da se koristi aktivni mulj.

Mogu se koristiti razni inokulumi. U ovoj metodi data su tri primera pogodnih inokuluma: inokulum iz sekundarnog efluenta, kompozitni i inokulum aktivnog mulja.

Inokulum iz sekundarnog efluenta

Inokulum se uzima iz sekundarnog efluenta zadovoljavajućeg kvaliteta prikupljenog iz postrojenja za obradu dominantno komunalnih otpadnih voda. Tokom perioda od uzimanja efluenta do njegove upotrebe, efluent se čuva u aerobnim uslovima. Za pripremu inokuluma, uzorak efluenta se filtrira kroz grubi filter, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Inokulum se upotrebljava isti dan po uzimanju uzorka sekundarnog efluenta. Za inokulaciju se koristi najmanje 3 ml efluenta.

Kompozitni inokulum

Za pripremu kompozitnog inokuluma koriste se tri parcijalna inokuluma:

1) inokulum iz sekundarnog efluenta;

2) inokulum iz zemljišta:

- 100 g baštenskog zemljišta (plodnog, ne sterilnog) suspenduje se u 1.000 ml nehlorisane vode za piće. (Zemljište sa izuzetno velikim udelom gline, peska ili humusa nije pogodno.) Nakon mešanja, suspenzija se ostavi 30 minuta da se istaloži. Supernatant se filtrira kroz grubi filter papir, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se aeriše odmah sve do upotrebe. Inokulum se upotrebljava isti dan po uzorkovanju;

3) inokulum iz površinske vode:

- deo za kompozitni inokulum uzima se iz mezo-saprobne površinske vode. Uzorci se filtriraju kroz grubi papir, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se čuva u aerobnim uslovima sve do upotrebe. Inokulum upotrebiti isti dan po uzorkovanju.

Kompozitni inokulum se uzima iz mešavine tri parcijalna inokuluma tako što se jednake zapremine sjedine i dobro promešaju. Za inokulaciju se upotrebljava najmanje 3 ml.

Inokulum aktivnog mulja

Uzima se najviše 3 L aktivnog mulja (sadržaj suspendovanih materija do 2,5 g/l) uzetog iz aeracionog bazena postrojenja za obradu dominantno komunalnih otpadnih voda.

**1.6.2. Postupak**

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi, koja se održava između 18° C i 25° C.

Ispitivanje se može izvesti i na nižim temperaturama (do 10° C). Ako se supstanca razgrađuje, ne nastavlja se ispitivanje. Ako se supstanca ne razgrađuje, ispitivanje se obavlja na stalnoj temperaturi između 18° C i 25° C.

*1.6.2.1. Period stabilizacije: obrazovanje mulja / stabilizacija sistema*

Period rasta/stabilizacije mulja je period u toku kojeg koncentracija suspendovanih materija aktivnog mulja kao i rad sistema dostiže stabilno stanje u uslovima definisanim ovom metodom.

Period stabilizacije jeste period koji traje od trenutka uvođenja ispitivane supstance u sistem do trenutka kad proces uklanjanja supstance dostigne plato, (relativno konstantnu vrednost). Ovaj period ne sme biti duži od šest sedmica.

Period evaluacije traje tri sedmice i to od trenutka kad uklanjanje ispitivane supstance dosegne relativno stalnu i najčešće visoku vrednost. Za one supstance koje se u prvih šest sedmica slabo ili uopšte biološki ne razgrade, za period evaluacije se uzimaju naredne tri sedmice.

Na početku se inokulum pomešan sa influentom uvodi u sisteme potrebne za jedno ispitivanje.

Zatim se uključuje aerator (u slučaju kad se koristi sistem OECD potvrdnog ispitivanja), a uključi se i pumpa za recirkulaciju (E) aktivnog mulja) i pumpa za doziranje (B).

Influent bez ispitivane supstance prolazi kroz aerator (C) brzinom 1 litar na sat ili 0,5 litara na sat, što omogućava retenciono vreme od 3 sata odnosno 6 sati.

Stepen aeracije namestiti tako da se onemogući taloženje sadržaja u posudi (C), dok je sadržaj rastvorenog kiseonika najmanje 2 mg/l.

Stvaranje pene onemogućiti odgovarajućim sredstvima, ali samo ukoliko ne deluju ihibitorno na aktivni mulj.

Mulj koji se nakupi pri vrhu aeratora (C) (u slučaju sistema OECD potvrdnog ispitivanja pri dnu separatora (D) i u sistemu za recirkulaciju) struganjem ili na neki drugi odgovarajući način vratiti u suspenziju najmanje jednom dnevno, svaki dan.

Ako se mulj ne taloži, povećati njegovu gustinu dodavanjem 2 ml 5% rastvora gvožđe-hlorida. Ovaj postupak se po potrebi ponavlja.

Efluent se prikuplja u posudi (E ili F) u toku 20 do 24 sata, a uzorak se uzima nakon temeljnog mešanja. Posudu (E ili F) pažljivo očistiti.

Da bi se nadgledala i kontrolisala efikasnost postupka, mere se hemijska potrošnja kiseonika (HPK) ili rastvoreni organski uglenik (DOC) u filtratu nakupljenog efluenta najmanje dva puta sedmično, kao i u filtratu influenta (koristeći membrane promera 0,45 mm, a prvih 20 ml filtrata se baca).

Kad se uspostavi približno ujednačena dnevna razgradnja, smanjenje DOC ili HPK treba da bude ujednačeno.

Sadržaj suve materije aktivnog mulja (g/l) u aeratoru određuje se dvaput sedmično. Sistemi mogu raditi na jedan od dva načina:

1) sadržaj suve materije u aktivnom mulju određuje se dvaput sedmično, pa ukoliko ga ima više od 2,5 g/l višak aktivnog mulja se odbacuje, ili

2) svakodnevno se ispušta 500 ml ispitivane smeše iz svake posude da se dobije srednje vreme retencije mulja od 6 dana.

Kada su izmereni i procenjeni parametri dva sistema dovoljno stabilni (efikasnost uklanjanja DOC ili HPK, mulj, koncentracija, taloženje mulja, zamućenost efluenta, itd), ispitivana supstanca može se dodati influentu koji ulazi u jedan od sistema, kako je opisano u odeljku 1.6.2.2. ove metode.

Alternativno, ispitivana supstanca se može dodati na početku perioda rasta mulja (videti odeljak 1.6.2.1. ove metode), naročito kad se mulj dodaje kao inokulum.

*1.6.2.2. Procedura ispitivanja*

U periodu stabilizacije održavaju se konstantni uslovi rada sistema. Odgovarajuća količina rastvora ispitivane supstance (oko 1%) dodaje se u influent koji ulazi u sistem, tako da se dobije željena koncentracija ispitivane supstance (10 mg do 20 mg DOC/l ili 40 mg HPK/l) u influentu. To se može postići svakodnevnim mešanjem osnovnog rastvora ispitivane supstance sa influentom ili pomoću sekundarne pumpe. Željena koncentracija može se postići postepeno. Ukoliko ispitivana supstanca ne ispoljava toksično dejstvo na aktivni mulj, može se testirati i viša koncentracija.

U sistemu koji služi kao kontrola uvodi se samo influent bez ispitivane supstance. Odgovarajuće zapremine efluenta uzimaju se za analizu i filtriraju kroz membranske filtere (0,45 mm). Prvih (otprilike) 20 ml filtrata se baca.

Filtrirani uzorci se analiziraju istog dana; u suprotnom se čuvaju pogodnom metodom, npr. korišćenjem 0,05 ml 1% rastvora žive-hlorida (HgCl2) na svakih 10 ml filtrata ili čuvanjem na temperaturi od 2° C do 4° C, najviše 24 sata ili na temperaturi nižoj od -18°C u toku dužeg vremena.

Period stabilizacije, uz dodatak ispitivane supstance, ne sme trajati duže od 6 sedmica i period evaluacije ne sme biti kraći od 3 sedmice, odnosno za izračunavanje konačnog rezultata imati oko 14 do 20 rezultata merenja.

Izvođenje sa spojenim sistemima

Spojeni sistemi rade tako da jednom dnevno između dva sistema dolazi do razmene 1,5 L ispitivane smeše (uključujući mulj) iz aeratora za aktivni mulj. U slučaju da ispitivana supstanca podleže adsorpciji, uzima se 1,5 L tečnog supernatanta iz taložnika jednog sistema i presipa u posude sa aktivnim muljem drugog sistema.

*1.6.2.3. Analiza*

U cilju praćenja svojstava supstance vrše se dve vrste analiza: DOC i HPK.

Koncentracije DOC određuju se u dva ponavljanja pomoću analizatora ugljenika, odnosno vrednosti HPK prema literaturi**2**.

Specifična analiza

Koncentracije ispitivane supstance određuju se odgovarajućim analitičkim postupkom. Ukoliko je moguće, odrediti i količinu supstance koja se adsorbuje na aktivni mulj.

**2. PODACI I PROCENA**

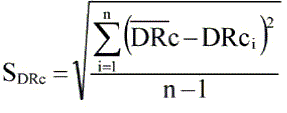
*2.1. SPOJENI SISTEMI*

Kad se koriste spojeni sistemi, dnevni stepen uklanjanja (u daljem tekstu: DR) izračunava se na način opisan u odeljku 1.2.1. ove metode. DR se formulom (2) koriguje na DRc zbog prenosa ispitivane supstance na opisani način za srednje vreme retencije od 3 sata ili formulom (3) za srednje vreme retencije od 6 sati.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| DRc = | 4 | DR - | 100 |  |
| 3 | 3 | (2) |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| DRc = | 8 | DR - | 100 |  |
| 7 | 7 | (3) |

Izračunava se srednja vrednost i standardne devijacije za seriju vrednosti DRc prema jednačini (4):

(4)

pri čemu:

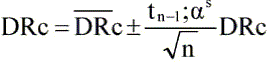
SDRc jeste standardna devijacija za niz DRc vrednosti;

DRDRc = srednja vrednost DRc;

*n* jeste broj određivanja.

Ekstremne vrednosti u nizu vrednosti DRc odbacuju se odgovarajućim statističkim postupkom, npr. Nalimovim postupkom**6**, uz nivo verovatnoće od 95%, pa se srednja vrednost i standardna devijacija ponovo izračunavaju za skup podataka DRc bez ekstremnih vrednosti.

Konačan rezultat izračunava se prema jednačini (5):

(5)

pri čemu:

tn-1;αs jeste tabelarna vrednost *t* za *n* vrednost parova E i Eo i statistička pouzdanost P (P = 1- a) i time je P na 95%**1**.

Rezultat se izražava kao srednja vrednost sa 95% intervalima poverenja, standardnim devijacijama i brojem podataka u skupu podataka DRc bez ekstremnih vrednosti, te brojem ekstremnih podataka, npr:

DRc = 98,6 ± 2,3% uklonjenog DOC;

*c* jeste 4,65% uklonjenog DOC;

*n* jeste 18;

*x* jeste broj ekstremnih vrednosti.

*2.2. ODVOJENI SISTEMI*

Rad sistema se može proveriti pomoću sledećeg izraza:

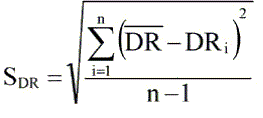
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| procenat uklanjanja COD ili DOC = | COD ili DOC influenta-COD ili DOC efluenta | x 100 |
| COD ili DOC influenta |

Ove vrednosti za dnevno uklanjanje DOC ili HPK mogu se prikazati grafički da bi se uočilo postojanje nekog trenda, npr. aklimatizacije.

**2.2.1. Određivanje HPK/DOC**

Kako se izračunava DR dato je u odeljku 1.2.1. ove metode.

Izračuna se srednja vrednost za serije vrednosti DR. Uz to se računa i standardna devijacija prema sledećem izrazu:

(6)

pri čemu:

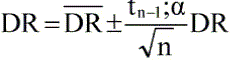
SDR jeste standardna devijacija serije DRi vrednosti,

DR jeste srednja vrednost DRi vrednosti,

*n* jeste broj određivanja.

Ekstremne vrednosti u nizu vrednosti DRc se odbacuju odgovarajućim statističkim postupkom, npr. Nalimovim postupkom**6**, uz nivo verovatnoće od 95%, pa se srednja vrednost i standardna devijacija ponovo izračunavaju za skup podataka DRc bez ekstremnih vrednosti.

Konačan rezultat se zatim izračuna prema formuli (7) kao:

(7)

pri čemu:

tn-1;α jeste tabelarna vrednost t za n vrednost parova E i Eo i statistička pouzdanost P (P = 1- a) čime je P postavljen na 95%**1**.

Rezultat se izražava kao srednja vrednost sa 95% intervalima poverenja, standardnim devijacijama i brojem podataka u skupu DR bez ekstremnih vrednosti, te brojem ekstremnih vrednosti, npr:

DR jeste (98,6 ± 2,3)% uklonjenog DOC;

*c* jeste (4,65)% uklonjenog DOC;

*n* jeste 18;

*x* jeste broj odstupajućih vrednosti.

**2.2.2. Primena specifične analize**

Kako se izračunava procenat uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze (Rw) dato je u odeljku 1.2.2. ove metode.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj, ako je moguće, sadrži:

- obrazac dat u Delu četvrtom ove metode, sa opisanim uslovima u ispitivanju;

- odabrani sistem (OECD potvrdno ispitivanje ili "porozna posuda");

- odabrani način rada, spojeni sistem ili neki drugi;

- vrstu otpadnih voda: sintetičke ili komunalne otpadne vode (u slučaju komunalne otpadne vode navesti datum i mesto uzorkovanja);

- vrstu inokuluma, sa datumom i mestom uzorkovanja;

- opis primenjenog analitičkog postupka, ukoliko su se obavljale specifične analize;

- grafički prikaz vrednosti uklanjanja HPK ili DOC u funkciji vremena, uključujući period stabilizacije i period evaluacije;

- efikasnost analitičke metode za određivanja sadržaja ispitivane supstance preko vrednosti HPK ili DOC za osnovni rastvor ispitivane supstance;

- ukoliko su rađene specifične analize, grafički prikaz vrednosti procenta uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze u funkciji vremena (period stabilizacije i period evaluacije);

- srednja vrednost i standardna devijacija uklanjanja DOC ili HPK ispitivane supstance izračunavaju se iz podataka za period evaluacije, odnosno kad postoji ravnomerno uklanjanje ispitivane supstance ili period ustaljenog rada jedinica sistema;

- grafički prikaz koncentracije aktivnog mulja u funkciji vremena;

- sve napomene u vezi sa aktivnim muljem (odbacivanje suviška mulja, pojave agregacije, FeCl3 itd);

- koncentracije ispitivane supstance korišćene u ispitivanju;

- svi rezultati u vezi sa aktivnim muljem;

- svi podaci i rezultati ispitivanja u vezi sa ispitivanom i referentnim supstancama, ako su korišćene;

- naučno opravdani razlozi za eventualne izmene postupka ispitivanja.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Nizak stepen uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze može biti posledica inhibitornog delovanje ispitivane supstance na mikroorganizame aktivnog mulja. Ovo se, takođe, može dokazati opažanjem lize ćelija mikroorganizama i gubitka mulja, što daje zamućeni supernatant, kao i smanjenja efikasnosti rada postrojenja u uklanjanju HPK (ili DOC).

Ponekad može imati uticaja fizičko-hemijska adsorpcija. Razlike između biološkog delovanja na molekul i fizičko-hemijske adsorpcije se mogu otkriti analizom mulja nakon odgovarajuće desorpcije.

Dodatna ispitivanja su potrebna ukoliko se žele razlučiti procesi biološke razgradnje (ili delimične biološke razgradnje) od adsorpcije.

To se može uraditi na nekoliko načina, ali najbolje je koristiti supernatant za inokulum u bazičnom ispitivanju (najbolje respirometrijsko ispitivanje).

Ako se primeti visok stepen uklanjanja DOC ili HPK, onda je to posledica biorazgradnje. Pri nižem stepenu uklanjanja, proces biorazgradnje ne može se razlikovati od procesa eliminacije. Na primer, ako jedinjenje rastvorljivo u vodi pokazuje visok stepen adsorpcije od 98%, a dnevna stopa potrošnje mulja veća je za 10%, moguća je eliminacija do 40%; pri višku stope potrošnje mulja od 30%, eliminacija zbog adsorpcije na suvišak mulja i uklanjanja zajedno sa tim suviškom mulja može narasti i na 65%**4**.

Kad se izvode specifične analize, obratiti pažnju na odnos strukture supstance i vrste analiza koje se rade. U ovom slučaju, uočeni fenomen ne može se protumačiti kao mineralizacija supstance.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Annex V C9 Degradation Test - Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, (OJ L251, 19.9.1984, p. 1).31.5.2008 EN Official Journal of the European Union L 142/553

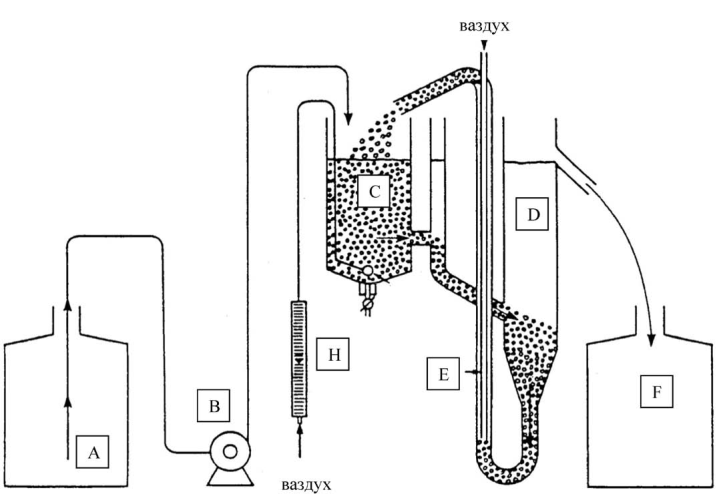
3. Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70,June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

4. Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing Compounds in activated sludgeplants, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 5, No 2, June 1981, p. 161-171.

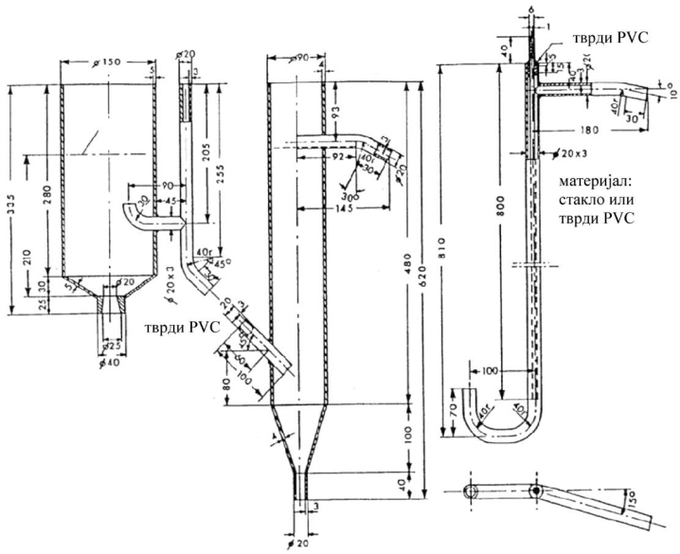
5. Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, (OJ, No L 109, 22.4.1982, p. 1), amending CouncilDirectives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, (OJ L 347, 17.12.1973, p.51).

6. Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreßertests, insbesondere bei Ringversuchenzur Oberprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius-Zeitschrift fürAnalytische Chemie, 303 (1980), p. 406-408.

**Deo drugi**



|  |  |
| --- | --- |
| A - spremnik | E - pumpa za recirkulaciju mulja |
| B - pumpa za doziranje | F - kolektor |
| C - aerator | G - difuzer vazduha |
| D - taložnik | H - merač protoka vazduha |



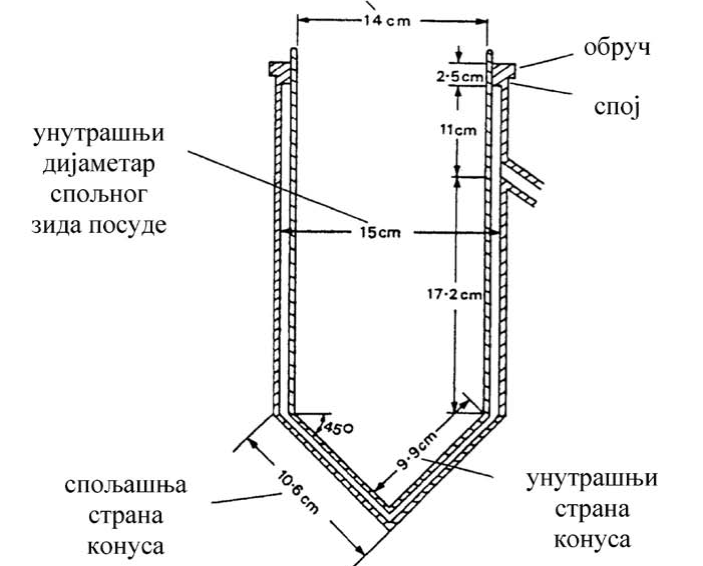
**Deo treći**

Slika 1. Oprema koja se koristi za procenu biorazgradljivosti

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s103.gif | A - spremnik  B - pumpa za doziranje  C - porozna posuda za aeraciju  D - spoljni nepropustljivi ventil  E - kolektor  F - difuzer vazduha  H - rotometar (opciono) |

Slika 2. Shema trolitarske porozne posude za aeraciju

unutrašnji dijametar posude



**Deo četvrti**

**USLOVI U ISPITIVANJU SIMULACIJE AKTIVNOG MULJA**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Upisati za svaku grupu |  |  |
| Oprema - vrsta sistema |  |  |
| OECD potvrdno ispitivanje |  |  |
| "porozna posuda" |  |  |
| Način izvođenja ispitivanja |  |  |
| pojedinačni |  |  |
| spojeni sistemi |  |  |
| ne-spojeni sistemi |  |  |
| Transinokulacija |  |  |
| ne |  |  |
| aktivni mulj |  |  |
| supernatant |  |  |
| Srednje retenciono vreme |  |  |
| 3 sata |  |  |
| 6 sati |  |  |
| Otpadna voda |  |  |
| komunalna otpadna voda |  |  |
| sintetička otpadna voda |  |  |
| Inokulum |  |  |
| sekundarni efluent |  |  |
| kompozit |  |  |
| aktivni mulj |  |  |
| Uvođenje ispitivane supstance |  |  |
| na početku ispitivanja |  |  |
| postepeno uvođenje |  |  |
| nakon stabilizacije aktivnog mulja |  |  |
| Analize |  |  |
| specifične analize |  |  |
| određivanje HPK |  |  |
| određivanje DOC |  |  |

**C.11. BIORAZGRADNJA - ISPITIVANJE INHIBICIJE RESPIRACIJE AKTIVNOG MULJA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Ovom metodom procenjuje se efekat ispitivane supstance (pri različitim koncentracijama) na mikroorganizme merenjem brzine respiracije u unapred definisanim uslovima.

Cilj metode je da se omogući brz skrining test kojim se identifikuju supstance koje mogu da imaju negativan uticaj na postrojenja za aerobno mikrobiološko prečišćavanje otpadnih voda i da se predlože smernice za izbor koncentracija ispitivane supstance za potrebe ispitivanja biorazgradljivosti.

Preliminarna studija može da se radi pre definitivnog ispitivanja. Ova studija daje podatke o opsegu koncentracija koje se koriste u definitivnom ispitivanju.

U postupak ispitivanja uključene su dve kontrole bez ispitivane supstance: jedna koja se postavlja na početku i druga na kraju, tj. nakon postavke svih serija koncentracija ispitivane supstance. Svaka kultura aktivnog mulja treba da se proveri ispitivanjem sa referentnom supstancom.

Metoda se najlakše primenjuje na supstance koje, zbog svoje rastvorljivosti u vodi i niske isparljivosti, obrazuju stabilne vodene rastvore.

Za supstance koje su slabo rastvorljive u medijumu koji se koristi za potrebe ovog ispitivanja nije uvek moguće odrediti vrednost EC50.

Rezultati koji se zasnivaju na potrošnji kiseonika mogu dovesti do pogrešnih zaključaka u slučaju kad ispitivana supstanca može da zaustavi oksidativnu fosforilaciju.

Za izvođenje ispitivanja poželjno je imati sledeće podatke o ispitivanoj supstanci:

- rastvorljivost u vodi;

- napon pare;

- strukturna formula;

- stepen čistoće ispitivane supstance.

Preporuka: Aktivni mulj može da sadrži potencijalno patogene organizme, pa je pri radu sa aktivnim muljem potreban oprez.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Brzina respiracije jeste potrošnja kiseonika mikroorganizama aktivnog mulja, koja se izražava kao mg O2 po mg mulja po satu.

Za izračunavanje inhibitornog efekta ispitivane supstance pri određenoj koncentraciji, brzina respiracije izražava se kao procenat srednje vrednosti brzine respiracije u dve kontrole:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif | 1 - |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | x 100 = % inhibicije |
| 2Rc |
| Rc1 + Rc2 |
|  |

pri čemu:

Rc jeste brzina potrošnje kiseonika pri datoj koncentraciji ispitivane supstance;

Rc1 jeste brzina potrošnje kiseonika u kontroli 1;

Rc2 jeste brzina potrošnje kiseonika u kontroli 2.

U ovoj metodi EC50 jeste koncentracija ispitivane supstance pri kojoj brzina respiracije iznosi 50% u odnosu na brzine respiracije u kontroli pod uslovima definisanim za ovu metodu.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Kao referentna supstanca preporučuje se 3,5-dihlorofenol, supstanca koja je poznata kao inhibitor respiracije. Za proveru osetljivosti odrediti EC50 vrednost za ovu supstancu za svaku kulturu aktivnog mulja.

*1.4. PRINCIP METODE*

Brzina respiracije aktivnog mulja pomešanog sa standardnom količinom sintetičke otpadne vode meri se nakon kontakta od 30 minuta, tri sata ili u oba vremena. Brzina respiracije istog aktivnog mulja meri se nakon izlaganja različitim koncentracijama ispitivane supstance u identičnim uslovima. Inhibitorni efekat ispitivane supstance pri određenoj koncentraciji izražava se kao procenat srednje vrednosti brzine respiracije u odnosu na dve kontrole. Vrednost EC50 izračunava se iz rezultata za seriju koncentracija ispitivane supstance.

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Rezultati ispitivanja su validni ako:

- vrednosti brzine respiracije u kontroli se razlikuju manje od 15%;

- EC50 (30 minuta, odnosno 3 sata) za 3,5-dihlorofenol se nalazi unutar prihvaćenog opsega od 5 do 30 mg/l.

**1.6. OPIS METODE**

**1.6.1. Reagensi**

*1.6.1.1. Ispitivani rastvori*

Na početku ispitivanja pripreme se sveži rastvori ispitivane supstance iz osnovnog rastvora. Osnovni rastvor ispitivane supstance od 0,5 g/l je odgovarajući ukoliko se ispitivanja izvode prema uputstvima datim u ovoj metodi.

*1.6.1.2. Rastvor referentne supstance*

Rastvor 3,5-dihlorofenola može se pripremiti, tako što se, npr. rastvori 0,5 g 3,5-dihlorofenola u 10 ml 1M NaOH, dopuni do otprilike 30 ml sa destiliovanom vodom, doda uz mešanje 0,5M H2SO4 sve dok se dođe do precipitacije - potrebno oko 8 ml 0,5M H2SO4 - i na kraju dopuni do jednog L sa destilovanom vodom. Vrednost pH treba da bude između 7 i 8.

*1.6.1.3. Sintetičke otpadne vode*

Sintetička otpadna voda se priprema rastvaranjem sledećih količina supstanci u 1 L vode:

- 16 g peptona;

- 11 g mesnog ekstrakta;

- 3 g uree;

- 0,7 g NaCl;

- 0,4 g CaCl2Í2H2O;

- 0,2 g MgSO4Í7H2O;

- 2,8 g K2HPO4.

Napomena 1: Ova sintetička otpadna voda je 100 puta koncentrovanija od otpadne vode opisane u literaturi**9**, uz dodatak dikalijum hidrogen fosfata.

Napomena 2: Ako se pripremljeni medijum ne koristi odmah, čuva se u mraku na na temperaturi od 0° C do 4° C, ne duže od jedne sedmice u uslovima koji obezbeđuju njegovu stabilnost. Medijum se pre skladištenja može i sterilizovati, ili se pepton i mesni ekstrakt mogu dodati neposredno pre izvođenja ispitivanja. Pre upotrebe, medijum se temeljno promeša i prilagodi vrednost pH.

**1.6.2. Oprema**

Aparatura za merenje: precizna postavka ispitivanja nije od presudne važnosti. Treba da postoji dovoljan slobodan prostor pri vrhu posude (headspace) i sonda čvrsto da prijanja uz vrat posude za merenje.

Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

- aparatura za merenje;

- aerator;

- pH-elektroda i oprema za merenje;

- O2-elektroda.

**1.6.3. Priprema inokuluma**

Aktivni mulj iz postrojenja za obradu dominantno komunalnih otpadnih voda koristi se kao mikrobiološki inokulum za potrebe ovog ispitivanja.

Ukoliko je potrebno, po povratku u laboratoriju, grube čestice se mogu ukloniti kratkotrajnim taloženjem, npr. 15 minuta, a zatim se dekantuje gornji sloj sa sitnijim česticama i koristi se za potrebe ispitivanja. Mulj se može promešati mikserom u trajanju od nekoliko sekundi.

Postoji sumnja da je prisutan materijal koji deluje inhibitorno, te se aktivni mulj ispere vodom iz česme ili izotoničnim rastvorom. Nakon centrifugiranja, supernatant se dekantuje (ovaj postupak se ponavlja tri puta).

Mala količina mulja se izmeri i osuši. Iz ovog rezultata može se izračunati količina vlažnog mulja koji je suspendovan u vodi da bi se dobio aktivni mulj sa koncentracijom čvrstih suspendovanih materija u opsegu od 2 g/l do 4 g/l. Ovaj nivo odgovara koncentraciji između 0,8 g/l i 1,6 g/l u medijumu ukoliko se ispitivanje izvodi prema smernicama.

Ako se mulj ne može upotrebiti istog dana, dodaje se 50 ml sintetičke otpadne vode u svaki litar aktivnog mulja pripremljenog na prethodno opisan način. Zatim se aktivni mulj aeriše preko noći na temperaturi od 20° C ± 2° C i aeriše se sve do ispitivanja. Pre izvođenja ispitivanja, proverava se pH vrednost i ukoliko je potrebno, podešava na 6 do 8 pH jedinica. Koncentracija suspendovanih čvrstih čestica u tečnoj smeši određuje se na način opisan u prethodnom paragrafu.

Ukoliko se koristi ista kultura aktivnog mulja za ispitivanja narednih dana (maksimalno četiri dana), dodati na 50 ml sintetičke otpadne vode po litru aktivnog mulja na kraju dana.

**1.6.4. Izvođenje ispitivanja**

Trajanje/kontaktno vreme: 30 minuta, odnosno 3 sata (neprekidna aeracija)

Voda: voda za piće (dehlorisana po potrebi)

Snabdevanje vazduhom: čist vazduh bez masnoća, dotok 0,5 L/min do 1 L/min

Aparatura za merenje: boce sa ravnim dnom, poput boca za određivanje BPK

Oksimetar: odgovarajuća elektroda za kiseonik, sa pisačem

Rastvor nutrijenata: sintetička otpadna voda

Ispitivana supstanca: sveže pripremljen rastvor supstance na početku ispitivanja

Referentna supstanca: npr. 3,5-dihlorofenol (ispituju se najmanje tri koncentracije)

Kontrole: inokuliran uzorak bez ispitivane supstance

Temperatura: 20° C ± 2° C

Za ispitivanje supstance i referentne supstance, u trajanju od 3 sata, predlaže se sledeći postupak:

- koristi se nekoliko posuda (npr. jednolitarske posude);

- ispituje se najmanje pet koncentracija ispitivane supstance, u geometrijskoj seriji sa faktorom povećanja 3,2;

- u nultom vremenu (t0) 16 ml sintentičke otpadne vode rastvori se sa vodom do 300 ml, doda se 200 ml mikrobiološkog inokuluma i dobijena smeša (500 ml) se presipa u prvu posudu (prva kontrola, K1);

- posude se neprekidno aerišu da bi se obezbedila koncentracija rastvorenog kiseonika iznad 2,5 mg/l i da bi neposredno pre merenja brzine respiracije, koncentracija rastvorenog kiseonika bila 6,5 mg/l;

- u vremenu t15 (15 minuta je arbitrarni, ali pogodan interval) ponovi se opisani postupak, s tim da se u 16 ml sintetičke otpadne vode doda 100 ml osnovnog rastvora ispitivane supstance, dopuni sa vodom do 300 ml i potom doda mikrobiološki inokulum do konačne zapremine od 500 ml. Dobijena smeša se presipa u drugu posudu i aeriše na isti način. Postupak se ponavlja svakih 15 minuta sa različitim zapreminama osnovnog rastvora ispitivane supstance, kako bi se dobio set posuda koje sadrže različite koncentracije ispitivane supstance. Na kraju se priprema druga kontrola (K2);

- nakon tri sata beleži se pH vrednost, a dobro promešani sadržaj iz prve posude presipa se u uređaj za merenje brzine respiracije u toku najviše 10 minuta;

- merenje se ponavlja sa sadržajem svake posude u intervalima od 15 minuta, kako bi vreme kontakta u svakoj posudi iznosilo 3 sata;

- referentna supstanca se na isti način ispituje na svakoj šarži mikrobiološkog inokuluma;

- primenjuje se drugačiji režim (npr. više od jednog oksimetra) u slučaju da se merenja vrše nakon 30 minuta;

- ako se meri hemijska potrošnja kiseonika, neophodno je pripremiti dodatne posude koje sadrže ispitivanu supstancu, sintetičke otpadne vode i običnu vodu, ali ne i aktivni mulj. Potrošnja kiseonika meri se i beleži nakon aeracije, tj. kontaktnog vremena.

**2. PODACI I PROCENA**

Brzina respiracije izračunava se sa krive između otprilike 6,5 mg/l O2 i 2,5 mg/l O2 ili u toku desetominutnog perioda kad je brzina respiracije niska. Deo krive respiracije iz koje se meri brzina respiracije da bude linearan.

Ako se vrednosti brzina respiracije u dve kontrole razlikuju za više od 15% ili EC50 (30 minuta, odnosno tri sata) za referentnu supstancu nije u okviru prihvaćenog opsega (5 mg/l do 30 mg/l za 3,5-dihlorofenol), ispitivanje nije validno i potrebno ga je ponoviti.

Procenat inhibicije izračunava se za svaku koncentraciju ispitivane supstance (videti odeljak 1.2. ove metode). Vrednosti procenta inhibicije za svaku koncentraciju ispitivane supstance predstavljaju se grafički u funkciji koncentracija na logaritmaskom (ili log-probit) papiru i očitava se EC50 vrednost.

Intervali poverenja od 95% za EC50 vrednosti mogu se odrediti pomoću standardnih postupaka.

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- podaci o hemijskoj identifikaciji;

2) Sistemu:

- izvor;

- koncentracija;

- predobrada aktivnog mulja (ako je rađena);

3) Uslovima ispitivanja:

- pH smeše pre merenja respiracije;

- temperatura;

- trajanje ispitivanja;

- referentna supstanca i izračunata vrednost EC50;

- abiotička potrošnja kiseonika (ukoliko postoji);

4) Rezultatima:

- svi rezultati merenja;

- kriva inhibicije i postupak za izračunavanje EC50;

- EC50 i, ako je moguće, 95% intervali poverenja, EC20 i EC80;

- sva opažanja i moguća odstupanja od ove metode ispitivanja koja mogu da utiču na rezultat.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

EC50 vrednost se smatra samo pokazateljem potencijalnog negativnog delovanja ispitivane supstance na proces obrade otpadne vode aktivnim muljem ili na mikroorganizme iz otpadne vode, s obzirom na to da se složene interakcije koje se događaju u životnoj sredini ne mogu verno simulirati u laboratorijskim uslovima. Rezultati ispitivanja sa supstancom koja može imati inhibitorni efekat na proces oksidacije amonijaka mogu dati atipične krive inhibicije. Stoga se ovi rezultati i ovakve krive tumače sa oprezom.

**4. LITERATURA**

1. International Standard ISO 8192-1986.

2. Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.

3. Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.

4. ETAD (ECOlogical and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, also described by:

5. Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.

6. Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.

7. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(84) 30 final.

8. OECD, June 11, 1976, Technical Report, 'Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents'.

**C.12. BIORAZGRADNJA - MODIFIKOVANA SCAS METODA ISPITIVANJA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

*1.1. UVOD*

Cilj ove metode je procena mogućnosti potpune biorazgradljivosti neisparljivih, organskih materija dobro rastvorljivih u vodi, ako su izložene relativno visokim koncentracijama mikroorganizama u toku dužeg vremenskog perioda. Životna aktivnost mikroorganizama održava se u toku tog perioda svakodnevnim dodavanjem taloga komunalne otpadne vode za prehranu. (Tokom vikenda, otpadna voda može se čuvati na temperaturi od 4° C. Može se koristiti i sintetička otpadna voda OECD potvrdnog ispitivanja.)

Prilikom tumačenja rezultata uzeti u obzir mogućnost fizičko-hemijske adsorpcije na suspendovane materije (videti odeljak 3.2. ove metode).

Zbog dugog vremena zadržavanja tečne faze (36 sati) i diskontinualnog dodavanja nutrijenata, metoda ne simulira uslove kakvi postoje u postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda. Rezultati ispitivanja sa različitim supstancama pokazuju da ova metoda ima veliki potencijal biorazgradljivosti.

Uslovi u ovom ispitivanju izrazito su povoljni za izbor, odnosno adaptaciju mikroorganizama sposobnih da razgrade ispitivano jedinjenje. (Postupak se može koristiti i za proizvodnju aklimatizovanih inokuluma za korišćenje u drugim ispitivanjima.)

Pomoću ove metode, potpuna biorazgradljivost ispitivanih supstanci procenjuje se na osnovu izmerene koncentracije rastvorenog organskog ugljenika. DOC je bolje odrediti nakon zakiseljavanja i čišćenja nego ga izračunati kao razliku C ukupni - C anorganski.

Istovremeno korišćenje specifičnog analitičkog postupka može da omogući procenu primarne biorazgradljivosti supstanci (nestanak početne hemijske strukture).

Postupak se može primeniti samo na organske supstance koje su, u koncentraciji primenjenoj u ispitivanju:

- rastvorljive u vodi (najmanje 20 mg/lDOC);

- imaju zanemarljiv napon para;

- nemaju inhibitorni efekat na bakterije;

- ne adsorbuju se u značajnoj meri unutar test sistema;

- ne gube se stvaranjem pene iz test rastvora.

Potrebno je utvrditi sadržaj organskog ugljenika u ispitivanom materijalu.

Podaci o relativnom udelu glavnih sastojaka ispitivanog materijala korisni su pri tumačenju dobijenih rezultata, posebno u slučajevima kad su dobijene vrednosti niske ili granične.

Podaci o toksičnosti supstanci za mikroorganizme mogu biti korisni u tumačenju niskih vrednost i izboru odgovarajuće ispitivane koncentracije.

*1.2. DEFINICIJE I JEDINICE MERE*

CT jeste koncentracija ispitivane supstance izražena kao organski ugljenik prisutan u ili dodat talogu otpadne vode na početku perioda aeracije (mg/l).

Ct jeste koncentracija rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu iz ispitivane grupe na kraju perioda aeracije (mg/l).

Cc jeste koncentracija rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu iz kontrole na kraju perioda aeracije (mg/l).

U ovoj metodi biorazgradljivost jeste nestanak organskog ugljenika. Biorazgradljivot se može izraziti kao:

Procenat razgradnje one količine supstance koja se svakodnevno dodaje - Dda (degradation/daily addition) računa se prema formuli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Dda = | CT - (Ct - Cc) | x 100 |
| CT |

Procenat razgradnje one količine supstance koja je prisutna na početku svakog dana -Dssd (degradation/substance start of day) računa se prema formuli:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dssd = | 2CT + Cti - Cci - 3Ct(i+1) + 3Cc(i+1) | x 100 |  |
| 2CT + Cti - Cci | 2(a) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 2CT - 2(Ct - Cc) | x 100 |  |
| 2CT + (Ct - Cc) | 2(b) |

Pokazatelji *i* i (*i* + 1) odnose se na dan merenja.

Jednačina 2(a) preporučuje se ako DOC u izlaznoj vodi (efluentu) varira svakodnevno, dok se jednačina 2(b) može koristiti kad DOC izlazne vode ima relativno stalne vrednosti.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance mogu biti od koristi kada se ispituje nova supstanca. Za ovu metodu nije preporučena neka određena referentna supstanca.

Podaci o nekoliko jedinjenja procenjenih u međulaboratorijskom ispitivanju (ringtest) ponuđeni su (videti Deo drugi ove metode) u cilju povremene kalibracije postupka i da se omogući poređenje rezultata dobijenih nekim drugim postupkom.

*1.4. NAČELO METODE ISPITIVANJA*

Aktivni mulj iz postrojenja za obradu otpadnih voda stavlja se u jedinicu za polukontinualnu obradu aktivnog mulja (u daljem tekstu: SCAS). Dodaju se ispitivana supstanca i talog komunalne otpadne vode. Ova mešavina se aeriše u toku 23 sata. Aeracija se nakon toga prekida, mešavina se ostavlja da se istaloži mulj, a tečni suprenatant se ukloni.

Preostali talog se meša sa narednom količinom ispitivanog jedinjenja i otpadne vode u aeracionoj komori i postupak se ponavlja na isti način.

Biorazgradljivost se utvrđuje određivanjem količine rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu. Ova vrednost se poredi sa vrednošću izmerenom u tečnoj fazi iz kontrole, u koju je dodat samo talog otpadne vode.

Kada se koristi specifični analitički postupak, mogu se meriti promene u koncentraciji izvornog molekula izazvane biorazgradnjom (primarna biorazgradnja).

*1.5. KRITERIJUMI KVALITETA*

Ponovljivost metode koja se bazira na uklanjanju rastvorenog organskog ugljenika nije utvrđena (kad se uzme u obzir primarna biorazgradljivost, dobiju se precizni podaci za materijale koji se dobro razgrađuju).

Osetljivost postupka zavisi od varijabilnosti slepe probe i u manjoj meri od preciznosti određivanja rastvorenog organskog ugljenika i koncentraciji test jedinjenja u tečnoj fazi na početku svakog ciklusa.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Priprema**

Potreban je dovoljan broj čistih jedinica za aeraciju, alternativno se može koristiti originalna SCAS test jedinica zapremine 1,5 L i cevi za dovod vazduha (Slika 1) za svaku test supstancu i kontrole. Komprimovani vazduh pročišćen kroz vatu koji se dovodi u test jedinice ne sme da sadrži organski ugljenik i prethodno da bude zasićen vodom da se smanje gubici isparavanjem.

Uzorak tečne mešavine, koja sadrži od 1 g do 4 g suspendovanih materija po litru, dobija se iz postrojenja za obradu aktivnog mulja koje obrađuje pretežno komunalnu otpadnu vodu. Za svaku aeracionu jedinicu potrebno je oko 150 mg tečne mešavine.

Osnovni rastvori ispitivane supstance pripremaju se u destilovanoj vodi. Najčešće je potrebna koncentracija od 400 mg/l kao organski ugljenik, što daje koncentraciju ispitivane supstance od 20 mg/l ugljenika na početku svakog ciklusa aeracije, ako ne dolazi do biološke razgradnje.

Mogu se koristiti i više koncentracije ako ne uzrokuju toksičan efekat na mikroorganizme.

U osnovnom rastvoru meri se sadržaj organskog ugljenika.

**1.6.2. Uslovi ispitivanja**

Ispitivanje se izvodi na temperaturi od 20° C do 25° C.

Koristi se visoka koncentracija aerobnih mikroorganizama (najviše 1 g/l do 4 g/l suspendovanih materija), a delotvoran period zadržavanja je 36 sati. Materijal koji sadrži ugljenik u najvećoj meri se oksiduje u hranljivoj podlozi od otpadnih voda, obično unutar osam sati nakon početka svakog ciklusa aeracije. Nakon toga, mulj diše endogeno za vreme preostalog perioda aeracije, u toku kojeg je ispitivano jedinjenje jedini raspoloživi supstrat, osim u slučaju da se i ono brzo razgrađuje. Ova svojstva, u kombinaciji sa dnevnom reinokulacijom kad se kao podloga koristi komunalna otpadna voda, obezbeđuju povoljne uslove za aklimatizaciju i za visoki stepen biološke razgradnje.

**1.6.3. Postupak**

Uzima se uzorak tečne mešavine iz uređaja laboratorijskog tipa ili pogodnog postrojenja za obradu aktivnog mulja iz pretežno komunalne otpadne vode i čuva u aerobnim uslovima do korišćenja u laboratoriji. Svaka aeraciona jedinica kao i kontrolna jedinica pune se sa po 150 mg tečne mešavine (ako se koristi originalna SCAS test jedinica, ta se zapremina množi sa 10) i započinje se sa aeracijom. Nakon 23 sata, aeracija se prekida i mulj se ostavlja 45 minuta da se istaloži. Naizmenično se otvaraju slavine svake posude i izvlači se po 100 mg tečnog supernatanta. Uzorak istaložene komunalne otpadne vode uzima se neposredno pre upotrebe, a 100 mg se dodaje mulju koji je preostao u svakoj aeracionoj jedinici. Ponovo se započinje sa aeracijom. U ovoj fazi ne dodaje se ispitivani materijal, a u jedinice se svakodnevno dodaje komunalna otpadna voda sve dok se nakon taloženja ne dobije supernatant u obliku bistre tečnosti. Za to je obično potrebno dve nedelje, a do kraja tog perioda rastvoreni organski ugljenik u tečnom supernatantu na kraju svakog aeracionog ciklusa približava se konstantnoj vrednosti.

Na kraju ovog perioda, pojedini istaloženi muljevi se pomešaju i u svaku jedinicu se doda po 50 mg ovako pripremljenog kompozita.

U kontrolne jedinice dodaje se po 95 mg istaložene otpadne vode i 5 mg vode, a u ispitivane jedinice 95 mg istaložene otpadne vode i 5 mg odgovarajućeg osnovnog rastvora ispitivanog jedinjenja (400 mg/l). Ponovo se započinje sa aeracijom koja traje 23 sata. Mulj se zatim ostavi 45 minuta da se slegne, izvuče se supernatant i analizira se sadržaj rastvorenog organskog ugljenika.

Opisani postupak ponavlja se svakodnevno u toku trajanja ispitivanja.

Pre taloženja, potrebno je očistiti čestice koje su se nakupile na zidovima jedinica iznad nivoa tečnosti. Za čišćenje svake jedinice koristiti posebnu strugalicu ili četku da se spreči međusobna kontaminacija.

U idealnom slučaju, rastvoreni organski ugljenik u tečnom supernatantu određuje se svakog dana, ali analize mogu biti i ređe. Tečnosti se pre analize filtriraju kroz isprane membranske filtere od 0,45 µm ili se centrifugiraju. Odgovarajući membranski filteri su oni koji ne otpuštaju ugljenik niti apsorbuju supstance u toku filtracije. Temperatura uzorka za vreme centrifugiranja ne sme biti veća od 40° C.

Dužina ispitivanja za jedinjenja koja se slabo ili uopšte biološki ne razgrađuju nije određena, ali na osnovu iskustva, treba da bude najmanje 12, a najviše 26 nedelja.

**2. PODACI I PROCENA**

Vrednosti rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu ispitivanih i kontrolnih jedinica grafički se prikazuju u funkciji vremena.

Kad se postigne biološka razgradnja, nivo te razgradnje u ispitivanim jedinicama približava se nivou razgradnje u kontrolnim jedinicama. Kad se razlika između dva nivoa u tri uzastopna merenja ustali, broj daljih merenja treba da bude dovoljan da omogući statističku obradu podataka i izračunavanje procenata biološke razgradnje (Dda ili Dssd, videti odeljak 1.2. ove metode).

**3. IZVEŠTAJ**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju, ako je moguće, sadrži:

- sve podatke o vrsti otpadne vode, tipu upotrebljene jedinice i rezultatima koji se tiču ispitivane supstance, referentne supstance - ako je korišćena, i slepe probe;

- temperaturu;

- krivu uklanjanja sa opisom, način izračunavanja (videti odeljak 1.2. ove metode);

- datum i mesto gde su uzeti uzorci aktivnog mulja i otpadne vode, status adaptacije, koncentracija, itd;

- naučno utemeljene razloge za moguće izmene ispitivanja postupka;

- potpis i datum.

*3.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Supstanca koja se ispituje ovom metodom nije biološki lako razgradljiva, te se do uklanjanja DOC izazvanog jedino biološkom razgradnjom dolazi postepeno u toku više dana ili nedelja, osim u slučaju kad naglo nastupi aklimatizacija na šta ukazuje nagli nestanak nakon nekoliko nedelja.

Fizičko-hemijska adsorpcija je nekada važna, što se vidi iz potpunog ili delimičnog uklanjanja dodatog DOC na početku ispitivanja. Ono što se dogodi nakon toga zavisi od faktora kao što je stepen adsorpcije i koncentracija suspendovanih materija u odbačenom efluentu. Obično se početno niska razlika između koncentracije DOC u kontrolnim i ispitivanim tečnim supernatantima postupno povećava i zatim se zadržava na novoj vrednosti do kraja ispitivanja, osim u slučaju aklimatizacije.

Ako se biorazgradljivost (ili delimična biorazgradljivost) želi razlikovati od adsorpcije, potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja. Najbolje je za ovo koristiti tečni supernatant ili mulj kao inokulum u osnovnom eksperimentu (najbolje je uraditi respirometrijsko ispitivanje).

Kad se u ovom ispitivanju dobije visok stepen uklanjanja DOC bez adsorpcije, ispitivana supstanca se smatra potencijalno biorazgradljivom. Delimično neadsorptivno uklanjanje ukazuje na delimičnu biorazgradljivost ispitivane supstance.

Ako je uklanjanje DOC nisko ili do njega ne dolazi, uzrok može biti inhibitorno dejstvo ispitivane supstance na mikroorganizame. To se može otkriti lizom i gubitkom mulja, što daje zamućen supernatant. Ispitivanje ponoviti pomoću nižih koncentracija ispitivane supstance.

Upotreba posebnog analitičkog postupka ili ispitivane supstance obeležene izotopom ugljenika C14 može povećati osetljivost.

Ako se koriste ispitivana jedinjenja označena sa C14, pronalazak C14 potvrđuje da je došlo do biorazgradnje.

Kad se rezultati prikazuju na osnovu primarne biorazgradnje, dati objašnjenje o promeni hemijske strukture koja dovodi do gubitka odgovora izvorne ispitivane supstance.

Validacija analitičkog postupka daje se zajedno sa odgovorom dobijenim na ispitnoj podlozi koja je služila kao slepa proba.

**4. LITERATURA**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

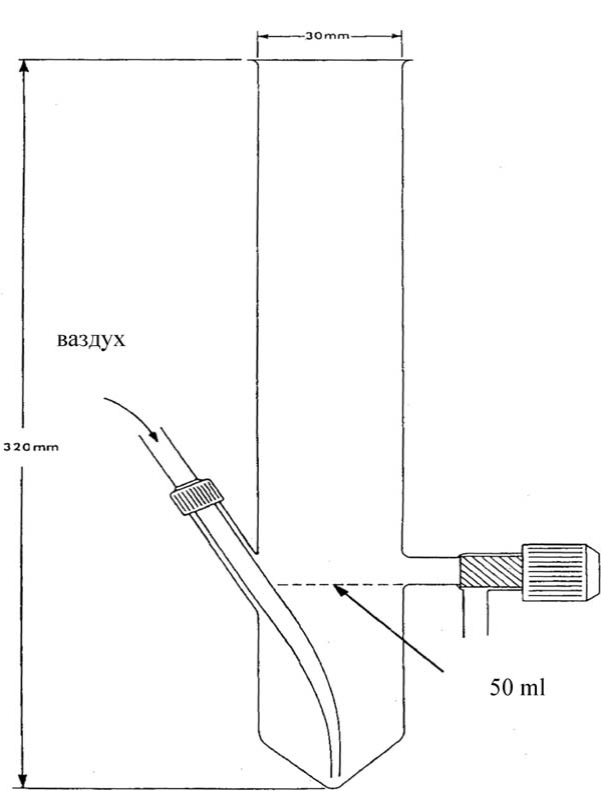
**Deo drugi**

**SCAS METODA ISPITIVANJA: PRIMER REZULTATA**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Supstanca | CT (mg/l) | Ct-Cc (mg/l) | Procenat biorazgradnje - Dda | Dužina ispitivanja (broj dana) |
| 4-acetil aminobenzen sulfonat | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| tetrapropilen benzen sulfonat | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-nitrofenol | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| Dietilen glikol | 16,5 | 0,2 | 98,8 | 40 |
| anilin | 16,9 | 1,7 | 95,9 | 40 |
| ciklopentan tetrakarboksilat | 17,9 | 3,2 | 81,1 | 120 |

**Deo treći**

**PRIMER OPREME ZA ISPITIVANJE**



**C.13. BIOKONCENTRACIJA: ISPITIVANJE NA RIBAMA U PROTOČNOM SISTEMU**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 305 (1996).

*1.1. UVOD*

Ovom metodom ispitivanja određuje se potencijal biokoncentracije ispitivane supstance u ribama kada se one drže u protočnom sistemu. Iako je protočni sistem najpogodniji, ispitivanje se može izvesti i u polustatičnom sistemu pod uslovom da su zadovoljeni kriterijumi kvaliteta.

U metodi su date precizne instrukcije za izvođenje ispitivanja, ali se dozvoljavaju modifikacije postupka ispitivanja u zavisnosti od laboratorijskih uslova, odnosno svojstava ispitivane supstanci. Metoda je namenjena za ispitivanje stabilnih organskih supstanci sa vrednostima log Pow između 1,5 i 6,0**1**, ali se mogu ispitivati i superlipofilne supstance (koje imaju vrednost log Pow > 6,0). Preliminarna procena faktora biokoncentracije (bioconcentration factor, u daljem tekstu: BCF), koji se ponekad označava sa KB, za takve superlipofilne supstance je veća od vrednosti faktora biokoncentracije u ravnotežnom do kojih se dolazi izvođenjem laboratorijskih ispitivanja. Preliminarne procene stanju (steady-state bioconcentration factor, u daljem tekstu: BCFSS) faktora biokoncentracije za organske supstance sa visokim vrednostima log Pow čak do 9,0 mogu se dobiti pomoću jednačine**2**. Parametri koji određuju biokoncentracioni potencijal uključuju konstantu brzine unosa (k1), konstantu brzine eliminacije (k2) i faktor biokoncentracije u ravnotežnom stanju BCFSS.

Ispitivanje sa obeleženim ispitivanim supstancama može olakšati analizu uzoraka vode i uzoraka tkiva ribe, ali može i pomoći u planiranju sledećih koraka - da li je potrebno identifikovati i kvantifikovati produkte razgradnje. Ukoliko se mere ukupni radioaktivni rezidijumi (npr. sagorevanjem ili rastvaranjem tkiva), BCF se odnosi na polaznu supstancu, preostale metabolite, kao i asimilirani ugljenik. Faktori biokoncentracije koji se baziraju na ukupnim radioaktivnim rezidijumima ne mogu se direktno porediti sa faktorima biokoncentracije koji su dobijeni specifičnim hemijskim analizama samo za polaznu supstancu.

Postupci čišćenja mogu se iskoristiti u ispitivanjima sa radioobeleženim supstancama da bi se odredila vrednost BCF za polaznu supstancu, a po potrebi se mogu okarakterisati i glavni metaboliti. Moguće je kombinovati studije proučavanja metabolizma riba i ispitivanja biokoncentracije putem analize i identifikacije rezidiuma u tkivima.

*1.2. DEFINICIJE I JEDINICE MERE*

Biokoncentracija/bioakumulacija jeste povećanje koncentracije ispitivane supstance u ili na organizmu (ili određenim tkivima) u odnosu na koncentraciju ispitivane supstance u odgovarajućem medijumu.

Faktor biokoncentracije (BCF ili KB) jeste odnos koncentracije ispitivane supstance u ili na ribi, ili određenim tkivima ribe (Cf se izražava u mg/g (ppm)) i koncentracije te supstance u okružujućem medijumu (Cw se izražava u μg/ml (ppm)), u bilo kom trenutku faze unosa tokom ispitivanja akumulacije supstance.

Faktor biokoncentracije u ravnotežnom stanju (BCFSS ili KB) se ne menja značajno u toku dužeg vremenskog perioda. Koncentracija ispitivane supstance u medijumu u toku ovog perioda je stalna.

Plato ili ravnotežno stanje se uočava kod grafičkog prikaza koncentracije ispitivane supstance u ribi (Cf) u funckiji vremena kao ravna linija paralelna sa *x*-osom. Ravnotežnim stanjem se smatra kada se rezultati tri uzastopna merenja koncentracije ispitivane supstance Cf u uzorcima uzetim u intervalima od najmanje dva dana međusobno razlikuju do ± 20% i kad ne postoje značajne razlike između tri perioda uzorkovanja. Kad se analiziraju združeni uzorci potrebno je uraditi najmanje četiri uzastopne analize. Za ispitivane supstance koje sporo usvajaju, pogodniji su intervali od sedam dana.

Faktor biokoncentracije koji se izračunava direktno preko vrednosti konstanti brzine unosa i eliminacije (k1/k2) jeste kinetički faktor biokoncentracije (u daljem tekstu: BCFK).

Koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda (Pow) jeste odnos vrednosti za rastvorljivost hemijske supstance u *n*-oktanolu i vrednosti za rastvorljivost u vodi u ravnotežnom stanju (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku). Logaritam od Pow koristi se kao indikator biokoncentracionog potencijala hemijske supstance u akvatičnim organizmima.

Faza izloženosti ili unosa jeste vreme u toku kojeg je riba izložena ispitivanoj supstanci.

Konstanta brzine unosa (k1) jeste numerička vrednost kojom se definiše stepen porasta koncentracije ispitivane supstance u/na ribi (ili određenim tkivima ribe) kad je riba izložena datoj supstanci (k1 se izražava u dan-1).

Faza post-izloženosti ili faza eliminacije jeste period u kome dolazi do smanjenja (ili potpune eliminacije) ispitivane supstance iz jedinki (ribe) (ili određenog tkiva te ribe), a nastupa nakon premeštanja jedinki iz medijuma u čist medijum (tj. medijum koji ne sadrži ispitivanu supstancu).

Konstanta brzine eliminacije (k2) jeste numerička vrednost kojom se definiše stepen smanjenja koncentracije ispitivane supstance u jedinci (riba) (ili određenim tkivima te ribe) nakon transfera jedinki iz medijuma u čist medijum (k2 se izražava kao dan-1).

*1.3. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

Ispitivanje se sastoji iz dve faze: faze izloženosti (unosa) i faze post-izloženosti (eliminacije). Tokom faze unosa, pojedinačne grupe riba iste vrste izložene su ispitivanoj supstanci u najmanje dve koncentracije. Ribe se zatim prenose u čist medijum i nastupa faza eliminacije. Faza eliminacije je neophodna, osim ukoliko je unos ispitivane supstance u toku faze unosa bio neznatan (npr. BCF manji od 10). Koncentracija ispitivane supstance u ili na ribi (ili određenim tkivima ribe) se prati u toku obe faze ispitivanja. Uz dve koncentracije ispitivane supstance (dve ispitivane grupe), postavlja se i kontrola sa jedinkama riba u uslovima identičnim onima u ispitivanim grupama, osim što kod kontrole jedinke nisu izložene ispitivanoj supstanci. Na taj način se uočeni negativni efekti u ispitivanim grupama mogu pripisati isključivo delovanju ispitivane supstance.

Faza unosa traje 28 dana, osim u slučaju kad se ravnotežno stanje uspostavi ranije. Trajanje faze unosa i vreme do postizanja ravnotežnog stanja može se predvideti pomoću jednačine iz Dela trećeg ove metode. Nakon toga započinje faza eliminacije: jedinke riba se premeštaju u drugi čisti akvarijum sa istim medijumom, ali bez ispitivane supstance. Kad je moguće, BCF izračunati i kao BCFSS, tj. kao odnos koncentracije supstance u ribi (Cf) i njene koncentracije u vodi (Cw) pri uočenom ravnotežnom stanju i kao BCFK, tj. odnos vrednosti konstanti brzine unosa (k1) i eliminacije (k2), ukoliko se proces može opisati kao kinetika prvog reda. Ukoliko se proces ne može opisati kao kinetika prvog reda, upotrebiti složenije modele (videti Deo šesti ove metode).

Ako se ravnotežno stanje ne postigne u roku od 28 dana, faza unosa se produžava do trenutka uspostavljanja ravnoteže ili najviše do 60 dana, kada se započinje sa fazom eliminacije.

Vrednosti za konstantu brzine unosa, konstantu brzine eliminacije (gubitka) (ili više konstanti, kad su uključeni složeniji modeli), faktor biokoncentracije i gde je to moguće, intervali poverenja za svaki od ovih parametara izračunavaju se iz modela koji najbolje opisuje izmerene koncentracije ispitivane supstance u ribi i vodi.

BCF se izražava u funkciji ukupne sveže težine ribe. U posebnim slučajevima mogu se koristiti određena tkiva ili organi (npr. mišići, jetra) ako je riba dovoljno velika ili se može podeliti u jestive (fileti) i nejestive delove (unutrašnji organi). Za mnoge organske supstance postoji jasna veza između biokoncentracionog potencijala i lipofilnosti, te postoji i odgovarajući odnos između sadržaja lipida u jedinkama ribe i uočene biokoncentracije tih supstanci. Da se smanji ovaj izvor varijabilnosti rezultata ispitivanja za supstance sa izraženom lipofilnošću (odnosno sa log Pow> 3), biokoncentraciju izraziti u odnosu na ukupnu težinu jedinke i u odnosu na sadržaj lipida u organizmu.

Kad je moguće, sadržaj lipida odrediti na istom biološkom materijalu u kojem se meri koncentracija ispitivane supstance.

*1.4. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Pre izvođenja ispitivanja biokoncentracije, imati sledeće podatke o ispitivanoj supstanci:

- rastvorljivost u vodi;

- koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda, Pow (označava se i sa Kow, određuje se HPLC metodom opisanom u Metodi A.8);

- hidroliza;

- fototransformacija u vodi pod prirodnim ili veštačkim osvetljenjem i u uslovima osvetljenja koji su definisani ovom metodom**3**;

- površinski napon (odnosno za supstance gde se log Pow ne može odrediti);

- napon pare;

- brza biološka razgradljivost (ako je odgovarajuće).

Ostali potrebni podaci uključuju toksičnost ispitivane supstance za izabranu vrstu ribe koja se koristi u ispitivanju, ako je moguće asimptotska LC50 (odnosno nezavisna od vremena). Na raspolaganju imati odgovarajuću analitičku metodu poznate tačnosti, preciznosti i osetljivosti za kvantifikaciju ispitivane supstance u rastvorima i u biološkom materijalu, kao i podatke o pripremi i čuvanju uzorka. Potrebno je da bude poznat limit detekcije ispitivane supstance kako u vodi, tako i u ribljim tkivima. Ako se koristi ispitivana supstanca obeležena sa izotopom ugljenika C14, znati i procenat radioaktivnosti koji se pripisuje nečistoćama.

*1.5. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Da bi se ispitivanje smatralo validnim potrebno je da budu ispunjeni uslovi:

- variranje temperature manje od ± 2° C;

- saturacija kiseonika veća od 60%;

- koncentracija ispitivane supstance u posudama (akvarijumima) održava se unutar ± 20% srednje vrednosti izmerene u toku faze unosa;

- smrtnost ili drugi štetni efekti/bolesti uočeni kod jedinki u kontroli i ispitivanim grupama da bude manja od 10% na kraju ispitivanja. Kad je ispitivanje produženo na nekoliko sedmica ili meseci, smrtnost ili drugi štetni efekti u kontroli i ispitivanim grupama treba da budu manji od 5% mesečno i da ne premašuju ukupno 30% u toku trajanja celog ispitivanja.

*1.6. REFERENTNE SUPSTANCE*

Ispitivanje referentnih supstanci za koje se raspolaže podacima o biokoncentracionom potencijalu može biti korisno za proveru procedure ispitivanja. Nisu preporučene određene referentne supstance.

*1.7. OPIS METODE*

**1.7.1. Oprema**

Svaki deo opreme je napravljen od inertnog materijala koji ne utiče štetno na jedinke koje se koriste u ispitivanju. Mogu se koristiti standardni pravougaoni ili cilindrični akvarijumi, napravljeni od hemijski internog materijala i odgovarajuće zapremine koji odgovara dinamici nasada. Upotrebu mekih plastičnih cevi svesti na najmanju moguću meru. Prednost se daje teflonu, nerđajućem čeliku, odnosno staklenim cevima. Iskustvo je pokazalo da za supstance sa visokim koeficijentima adsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, koristiti silanizirano staklo. Oprema se, u ovom slučaju, nakon upotrebe baca.

**1.7.2. Voda**

Uobičajeno se koristi obična voda, koja se dobija iz nekontaminiranog izvora sa ujednačenim kvalitetom. Kvalitet vode za razblaživanje je takav da za vreme trajanja perioda aklimatizacije i perioda ispitivanja omogući preživljavanje odabrane vrste riba i da ne izaziva negativne promene u izgledu i ponašanju jedinki. U idealnom slučaju, pokazuje se da izabrana vrsta ribe može da preživi, raste i razmnožava se u vodi za razblaživanje (npr. u laboratorijskoj kulturi ili u toku ispitivanja toksičnosti). U opisu kvaliteta vode navesti pH vrednost, tvrdoću, ukupne suspendovane materije, ukupan organski ugljenik. Poželjno je navesti i sadržaj amonijaka, nitrita i alkalitet, a za morske vrste i salinitet. Parametri potrebni za optimalan rast i razvoj riba potpuno su poznati i u Delu drugom ove metode date su preporučene maksimalne koncentracije seta parametara za slatku i morsku vodu koja se koristi u ispitivanju.

Tokom trajanja ispitivanja, voda je ujednačenog kvaliteta. Vrednost pH je između 6,0 i 8,5 i u toku ispitivanja se održava unutar opsega od ± 0,5. Da bi se osiguralo da voda za razblaživanje neće uticati na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance) ili da neće štetno uticati na jedinke odabrane vrste riba, potrebno je periodično uzimati uzorke vode za analizu. Mere se koncentracije teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Cu, Mg, Na, K, Cl, SO4), pesticida (npr. ukupne organofosforne i ukupne organohlorne pesticide), ukupnog organskog ugljenika i suspendvanih materija, npr. na svaka tri meseca ako se zna da je voda za razblaživanje relativno ujednačenog kvaliteta. Ako se utvrdi da je kvalitet vode ujednačen u toku najmanje godinu dana, provera kvaliteta može biti ređa, a intervali duži (npr. svakih 6 meseci).

Sadržaj prirodnih materija kao i ukupni organski ugljenik (u daljem tekstu: TOC) u vodi za razblaživanje treba da bude što manji da bi se izbegla adsorpcija ispitivane supstance na organsku materiju što može smanjiti biodostupnost supstance**4**. Maksimalna prihvatljiva vrednost za suspendovane materije je 5 mg/l (suve materije, ne prolazi filter od 0,45 mm) i za ukupni organski ugljenik 2 mg/l (videti Deo drugi ove metode). Voda se, po potrebi, filtrira pre upotrebe. Ekskreti jedinki, kao i ostaci hrane doprinose ukupnom sadržaju organskog ugljenika, pa ih svesti na minimalnu meru. Tokom čitavog perioda ispitivanja, koncentracija organskog ugljenika u akvarijumu ne treba da bude veća od koncentracije organskog ugljenika koja potiče od ispitivane supstance. Koncentracija rastvarača, ukoliko se koristi u ispitivanju, ne sme da bude veća od 10 mg/l (± 20%).

**1.7.3. Ispitivani rastvori**

Osnovni rastvor ispitivane supstance priprema se u odgovarajućoj koncentraciji. Osnovni rastvor se priprema mešanjem ili mućkanjem ispitivane supstance u vodi za razblaživanje. Ne preporučuje se upotreba rastvarača ili disperzionih sredstava. Nekada je neophodna upotreba ovih sredstava radi dobijanja osnovnih rastvora ispitivane supstance željene koncentracije. Rastvarači koji se mogu koristiti su etanol, metanol, etilenglikol monometil eter, etilenglikol dimetil eter, dimetilformamid i trietilen glikol. Disperziona sredstva koja se mogu koristiti su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Mere opreza uzeti u obzir kad se koriste brzo biološki razgradljiva disperziona sredstva, jer mogu prouzrokovati probleme sa rastom bakterija u ispitivanju u protočnim uslovima. Ispitivana supstanca može se označiti radioaktivnim izotopom i treba da bude najvišeg stepena čistoće (ako je moguće > 98%).

Za ispitivanje u protočnim uslovima potreban je sistem sa dispenzorom i diluterom rastvora ispitivane supstance (npr. pumpa sa meračem, sistem za proporcionalno razblaživanje, sistem za zasićenje) da bi se u akvarijumima održavala konstantna koncentracija te supstance. Poželjno je da se najmanje pet puta u toku dana izmeni celokupna zapremina akvarijuma. Prednost se daje ispitivanju u protočnim uslovima, ali u slučajevima gde to nije moguće (npr. kad postoje štetni efekti na organizme koje se koriste u ispitivanju) može se izvoditi i ispitivanje u semi-statičkim uslovima, ako su zadovoljeni kriterijumi validnosti. Protok osnovnog rastvora ispitivane supstance i vode za razblaživanje proverava se 48 sati pre početka i zatim najmanje jedanput dnevno u toku ispitivanja. Ova provera uključuje određivanje protoka u svakom akvarijumu i protok ne sme da varira više od 20% u jednom akvarijumu, kao i između akvarijuma.

**1.7.4. Izbor vrsta za potrebe ispitivanja**

Kriterijumi za izbor vrste riba su da su lako dostupne, da se mogu dobiti u odgovarajućim veličinama i da se mogu na zadovoljavajući način uzgajati u laboratoriji. Drugi kriterijumi za izbor vrste uključuju njenu komercijalnu, rekreacionu i ekološku važnost, kao i mogućnost poređenja osetljivosti sa drugim vrstama, prethodnu uspešnu upotrebu u ispitivanjima, itd.

Preporučene vrste za potrebe ove metode navedene su Delu drugom ove metode. Mogu se koristiti i druge vrste, ali u tom slučaju modifikovati metodu ispitivanja kako bi se obezbedili pogodni uslovi. U izveštaju se daje objašnjenje za izbor vrste i metode ispitivanja.

**1.7.5. Gajenje riba**

Aklimatizacija matičnog jata riba traje najmanje dve sedmice u vodi pri temperaturnom režimu i režimu ishrane definisanim za samo ispitivanje.

Nakon perioda aklimatizacije od 48 sati, uočava se smrtnost i primenjuju sledeći kriterijumi:

- ako je smrtnost veća od 10% populacije u sedam dana, celo matično jato se odbacuje;

- ako je smrtnost između 5% i 10% populacije u sedam dana, matično jato se aklimatizuje još sedam dana;

- ako je smrtnost manja od 5% populacije u sedam dana, matično jato se prihvata;

- ako je smrtnost iznad 5% u narednih 5 dana, celo jato se odbacuje.

Treba voditi računa da jedinke ribe koje se koriste u ispitivanju nemaju vidljivih bolesti i abnormalnosti. Svaka obolela jedinka isključuje se iz ispitivanja. Jedinke se ne smeju lečiti dve sedmice pre početka ispitivanja, kao niti za vreme samog ispitivanja.

*1.8. IZVOĐENJE ISPITIVANJA*

**1.8.1. Preliminarno ispitivanje**

Poželjno je izvesti preliminarno ispitivanje kako bi se postavili optimalni uslovi za konačno ispitivanje, npr. izbor ispitivanih koncentracija supstance, trajanje faza unosa i eliminacije.

**1.8.2. Uslovi izloženosti**

*1.8.2.1. Trajanje faze unosa*

Trajanja faze unosa može se predvideti na osnovu iskustva (npr. iz prethodnog ispitivanja, ili rezultata ispitivanja sa supstancom sličnog potencijala za akumulaciju) ili određenih empirijskih odnosa na osnovu poznavanja ili rastvorljivosti u vodi ili koeficijenta raspodele u sistemun-oktanol/voda za ispitivanu supstancu (videti Deo četvrti ove metode).

Faza unosa traje 28 dana, osim u slučaju kad se može uočiti da se ravnotežno stanje uspostavilo i ranije. Ako se ravnotežno stanje ne dostigne do kraja 28. dana, fazu unosa produžiti do dostizanja ravnotežnog stanja ili do 60 dana, zavisno od toga koji uslov se pre ispuni.

*1.8.2.2. Trajanje faze eliminacije*

Polovina vremena koliko traje faza unosa jeste dovoljno dug period da nastupi zadovoljavajuće smanjenje sadržaja ispitivane supstance u organizmu jedinke od npr. 95% (za objašnjenje procene videti Deo četvrti ove metode). Ako je vreme da se postigne 95% smanjenja nepraktično dugo i premašuje npr. dvostruku dužinu trajanja normalnog trajanja faze unosa (tj. više od 56 dana) može se koristiti kraći period (odnosno dok koncentracija ispitivane supstance ne dostigne vrednost manje od 10% ravnotežne koncentracije). Za određivanje konstanti brzine eliminacije supstanci kod kojih su procesi unosa i eliminacije složeniji i ne predstavljaju kinetiku prvog reda, produžiti trajanje faze eliminacije. Taj period može biti određen vremenom u toku kojeg koncentracija ispitivane supstance u ribi ostaje iznad limita detekcije.

*1.8.2.3. Broj jedinki riba*

Broj jedinki riba za svaku ispitivanu koncentraciju treba da bude dovoljan da obezbedi najmanje četiri jedinke ribe po uzorkovanju. Za preciznija statistička određivanja, potrebno je imati na raspolaganju veći broj jedinki riba.

Ukoliko se u ispitivanju koriste odrasle jedinke riba, u izveštaju navesti da li se radi o mužjaku ili ženki ili se koriste jedinke oba pola. Ako se koriste jedinke oba pola, potvrditi da razlike u sadržaju lipida između mužjaka i ženki pre početka izlaganja ispitivanoj supstanci nisu značajne. Može biti neophodno da se objedine uzorci za sve jedinke muškog i za sve jedinke ženskog pola.

Za svako ispitivanje biraju se jedinke približno iste težine, tako da težina najmanjih primeraka nije manja od dve trećine težine najvećih primeraka. Sve jedinke treba da budu istog uzrasta i da potiču iz istog matičnog jata. Primećeno je da težina i uzrast jedinki riba imaju značajan uticaj na vrednost BCF1, pa se ovi podaci navode u izveštaju. Preporučuje se da se pre ispitivanja iz matičnog jata uzme nekoliko jedinki riba i izmeri njihova težina kako bi se procenila srednja težina jedinki matičnog jata.

*1.8.2.4. Nasad*

Velika količina vode u odnosu na težinu jedinki riba koristi se kako bi se smanjila redukcija vrednosti Cw prouzrokovana dodavanjem jedinki ribe na početku ispitivanja i da bi se izbeglo smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika. Važno je da režim nasada jedinki ribe odgovara vrsti ribe koja se koristi u ispitivanju. Preporučuje se režim nasada od 0,1 g do 1,0 g ribe (sveže mase) po litru vode na dan. Povećan unos se koristi ako se pokaže da se tražena koncentracija ispitivane supstance može održati unutar granica od ± 20% i da saturacija kiseonika ne pada ispod 60%.

U izboru odgovarajućeg režima unosa, uzima se u obzir prirodno stanište date vrste riba. Na primer, riba koja živi pri dnu može za istu zapreminu vode zahtevati veću površinu dna u akvarijumu u odnosu na pelagijske vrste.

*1.8.2.5. Ishrana*

Tokom perioda aklimatizacije i perioda trajanja ispitivanja, ribe se hrane odgovarajućom hranom poznatog sadržaja lipida i ukupnih belančevina, u količini dovoljnoj da ih održi zdravima i sa stalnom telesnom težinom. Ribe se hrane svaki dan u toku čitavog perioda aklimatizacije i u toku trajanja ispitivanja u količini od približno 1% do 2% telesne težine dnevno. Ovakav režim održava sadržaj lipida kod većine ribljih vrsta na relativno ujednačenom nivou u toku ispitivanja. Količina hrane se preračunava, npr. jednom sedmično, kako bi se održala ujednačena telesna težina i ujednačen sadržaj lipida. Za ovaj preračun, težina jedinki u svakom akvarijumu određuje se na osnovu težine jedinki ribe koje su prethodni put uzete za uzorkovanje iz tog akvarijumu. Ne meri se težina preostalih jedinki u akvarijumu.

Hrana koja nije pojedena i ekskrementi svakodnevno se ispuštaju iz akvarijuma nakon hranjenja (30 minuta do 1 sat). Akvarijumi se održavaju čistim, u što većoj mogućoj meri, u toku čitavog trajanja ispitivanja, tako da se koncentracija organske materije održava na što nižem nivou, s obzirom na to da prisustvo organskog ugljenika može ograničiti biodostupnost ispitivane supstance**1**.

Mnoge vrste riblje hrane napravljene su od ribljih prerađevina, te analizirati sadržaj te hrane na prisustvo ispitivane supstance. Bilo bi dobro analizirati pesticide i teške metale u hrani.

*1.8.2.6. Svetlost i temperatura*

Fotoperiod uobičajeno traje 12 do 16 sati, a temperatura (± 2° C) treba da odgovara vrsti riba koja se koristi u ispitivanju (videti Deo treći ove metode). Vrsta i svojstva osvetljenja treba da budu poznati. Potreban je oprez zbog moguće transformacije ispitivane supstance pod uticajem svetlosti pri datim uslovima osvetljenja definisanim za ovu metodu. Koristi se odgovarajuće osvetljenje i izbegava izlaganje ribe veštačkom svetlu. U nekim slučajevima poželjno je koristiti odgovarajući filter za blokiranje UV zračenja talasne dužine ispod 290 nm.

*1.8.2.7. Koncentracije ispitivane supstance*

Ispitivanje se odvija u protočnom sistemu i ispituju se najmanje dve koncentracije ispitivane supstance. Viša ili najviša koncentracija ispitivane supstance obično je 1% akutne asimptotske vrednosti LC50 te supstance i potrebno je da bude najmanje deset puta viša od limita detekcije primenjenog analitičkog postupka.

Najviša ispitivana koncentracija supstance može da se odredi deljenjem 96 h LC50 vrednosti za akutnu toksičnost sa odgovarajućom ACR**VIII** vrednošću (ACR nekih hemikalija se kreće u rasponu od 3 do 100). Ukoliko je moguće, u ispitivanju se koristi jedna ili više drugih koncentracija koje se od najviše ispitivane koncentracije razlikuju za faktor 10. Ako to nije moguće, zbog kriterijuma od 1% LC50 i limita detekcije analitičke metode, može da se upotrebi manji faktor ili se razmatra ispitivanje supstance koja je obeležena radioaktivnim izotopom ugljenika - C14. Nijedna koncentracija ne treba da bude jednaka maksimalnoj rastvorljivosti ispitivane supstance.

Kada se koristi rastvarač, njegova koncentracija ne treba da bude veća od 0,1 ml/l i treba da bude ista u svim tretmanima. Rastvarač zajedno sa ispitivanom supstancom doprinosi ukupnom sadržaju organskog ugljenika u medijumu i treba da bude poznat njegov udeo u ukupnom sadržaju organskog ugljenika. Upotrebu rastvarača treba svesti na najmanju moguću meru.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**VIII** Odnos akutne i hronične toksičnosti (acute/chronic toxicity ratio) je faktorkoji služi za procenu hronične toksičnosti neke hemikalije na osnovu podataka o njenoj akutnoj toksičnosti i obrnuto.

*1.8.2.8. Kontrole*

U ispitivanju je potrebno imati jednu kontrolnu grupu sa jedinkama ribe samo u čistom medijumu ili, ukoliko je relevantno, dodatnu kontrolnu grupu sa rastvaračem, po uslovom da je prethodno utvrđeno da dati rastvarač ne ispoljava efekat na jedinke. U suprotnom, postavljaju se obe kontrolne grupe.

**1.8.3. Učestalost merenja kvaliteta vode**

Tokom ispitivanja u svim akvarijumima meriti: rastvoreni kiseonik, TOC, pH vrednost i temperaturi akvarijumima. Ukupna tvrdoća i salinitet, ukoliko su relevantni, mere se u kontrolama i u jednom akvarijumu sa višom (ili najvišom) koncentracijom. Rastvoreni kiseonik i salinitet, ukoliko je relevantno, mere se najmanje tri puta: na početku, oko sredine i na kraju faze unosa i jednom sedmično u toku faze eliminacije. TOC se meri na početku ispitivanja (24 sata i 48 sati pre početka faze unosa) pre unosa ribe i najmanje jedanput sedmično u toku faza unosa i eliminacije. Temperatura se meri svakodnevno. Vrednost pH se meri na početku i na kraju svake faze, a tvrdoća jedanput u toku ispitivanja. Poželjno je neprekidno meriti temperaturu najmanje u jednom akvarijumu.

**1.8.4. Uzorkovanje i analiziranje ribe i vode**

*1.8.4.1. Raspored uzorkovanja ribe i vode*

Uzorak vode iz komora za ispitivanje, radi određivanja koncentracije ispitivane supstance, uzima se pre unosa ribe i u toku faza unosa i eliminacije. Voda se uzima kad i riba i to pre njenog hranjenja. Tokom faze unosa, mere se koncentracije ispitivane supstance da bi se potvrdilo da su zadovoljeni kriterijumi kvaliteta.

Jedinke riba uzorkuju se najmanje pet puta u toku faze unosa i najmanje četiri puta u toku faze eliminacije. U nekim slučajevima je teško izračunati dovoljno preciznu procenu BCF vrednosti na osnovu ovog broja uzoraka, naročito kad se radi o procesu unosa i eliminacije koji se ne ponaša po modelu kinetike prvog reda, pa uzorkovanje obavljati češće u toku obe faze (videti Deo peti ove metode). Dodatni uzorci čuvaju se i analiziraju samo ako se rezultati prvog kruga analiza pokažu neodgovarajućima za izračunavanje BCF sa željenom preciznošću.

Primer prihvatljivog rasporeda uzimanja uzoraka dat je u Delu četvrtom ove metode. Drugi rasporedi mogu se odrediti pomoću drugih pretpostavljenih vrednosti Kow za izračunavanje trajanja izloženosti u kome dolazi do 95% unosa.

Uzorkovanje se nastavlja u toku faze unosa sve dok se ne uspostavi ravnotežno stanje ili u toku 28 dana, zavisno od toga koji se uslov pre ispuni. Ako se ravnotežno stanje ne postigne u toku 28 dana, uzorkovanje se nastavlja sve do postizanja ravnotežnog stanja ili do 60 dana, zavisno od toga koji uslov se pre ispuni. Pre početka faze eliminacije, jedinke riba se prenose u akvarijume sa čistim medijumom.

*1.8.4.2. Uzimanje i priprema uzoraka*

Uzorci vode za analizu uzimaju se npr. ispuštanjem vode kroz inertne cevi postavljene na sredini akvarijuma. Filtracija ni centrifugiranje ne odvajaju uvek frakcije ispitivane supstance koje nisu biodostupne od frakcija koje jesu biodostupne (važi naročito za superlipofilne hemikalije odnosno one hemikalije čiji je log Pow > 5)**1,5**. Nije uvek potrebno raditi filtriranje ili centrifugiranje uzoraka. Umesto toga, potrebno je komore za ispitivanje držati što čistijim, a u toku faza unosa i faze eliminacije prati se sadržaj ukupnog organskog ugljenika.

Pri svakom uzorkovanju odgovarajući broj jedinki riba (obično najmanje četiri) uklanja se iz komore za ispitivanje. Uzorkovane jedinke brzo se ispiraju vodom, obrišu od suvišne tečnosti, trenutno ubijaju na najhumaniji način i izmere.

Poželjno je analizirati uzorke vode i jedinki riba odmah posle uzorkovanja, čime se izbegava razgradnja ili drugi načini gubitka i omogućava izračunavanje brzina unosa i eliminacije u toku ispitivanja. Brzom analizom se omogućava pravovremeno određivanje tačke postizanja ravnotežnog stanja.

Ako se analiza ne obavi odmah, uzorci se čuvaju na odgovarajući način. Pre početka ispitivanja potrebno je imati podatke o odgovarajućim načinima skladištenja za ispitivanu supstancu, npr. zamrzavanje, čuvanje na temperaturi od 4 °C, trajanje skladištenja, ekstrakcija, itd.

*1.8.4.3. Kvalitet analitičkog postupka*

Metoda ispitivanja zavisi od tačnosti, preciznosti i osetljivosti primenjene analitičke metode za datu ispitivanu supstancu, pa je neophodno ispitivanjem proveriti da li su preciznost i ponovljivost hemijske analize, kao i efikasnost analitičkog postupka za ispitivanu supstancu u vodi i ribi, zadovoljavajući za određeni analitički postupak. Analizira se i voda za razblaživanje na prisustvo date ispitivane supstanca.

Po potrebi se koriguju vrednosti Cw i Cf dobijene iz ispitivanja i to pomoću vrednosti efikasnosti analitičke tehnike i vrednosti fona u kontroli. Potrebno je pažljivo rukovati uzorcima ribe i vode tako da se u najvećoj mogućoj meri onemogući kontaminacija i gubici (na primer gubici koji mogu nastati usled adsorpcije na opremu za uzorkovanje).

*1.8.4.4. Analiza uzoraka ribe*

Ako se u ispitivanju koriste obeležene supstance, može se analizirati ukupni radio obeleženi materijal (odnosno polazna supstanca i njeni metaboliti), ili uzorci mogu biti prečišćeni tako da se polazna supstance može analizirati posebno. Glavni metaboliti mogu se okarakterisati u ravnotežnom stanju ili na kraju faze unosa, zavisno od toga koji uslov se pre ispuni. Ako je BCF u smislu ukupnih radioaktivnih rezidijuma ± 1.000%, savetuje se (za određene kategorije hemikalija, kao što su pesticidi čvrsto preporučuje) da se identifikuju i kvantifikuju produkti razgradnje koji čine ± 10% ukupnih rezidijuma u tkivu ribe u ravnotežnom stanju. Ako se identifikuju i kvantifikuju produkti razgradnje koji čine ± 10% ukupnih radioaktivnih rezidijuma u ribljem tkivu, preporučuje se i identifikacija i kvantifikacija produkata razgradnje u medijumu.

Koncentracija ispitivane supstance se meri u svakoj jedinki ribe koja je prethodno izmerena. Ako to nije moguće, koncentracija ispitivane supstance može se odrediti u objedinjenom uzorku, ali takvo određivanje smanjuje broj statističkih postupaka koji se mogu primeniti na date podatke. Ako se uzimaju u obzir specifični statistički postupak i statistička snaga, u ispitivanje se uključuje odgovarajući broj jedinki riba da bi se zadovoljili kriterijumi za željeni postupak analize objedinjenih uzoraka i za statistički značaj ispitivanja**6, 7**.

BCF se izražava u funkciji ukupne sveže mase, a za visoko lipofilne supstance i u funkciji sadržaja lipida. Sadržaj lipida u ribama određuje se pri svakom uzimanju uzoraka, ukoliko je to moguće. Za određivanje sadržaja lipida koriste se odgovarajuće metode (videti Deo četvrti**8,2** ove metode). Kao standardna metoda preporučuje se tehnika ekstrakcije hloroform/metanol**9**. Različite metode daju različite vrednosti**10**, pa je važno detaljno opisati primenjenu metodu. Analiza sadržaja lipida po mogućnosti se sprovodi u istom ekstraktu u kojem se meri i koncentracija ispitivane supstance, s obzirom na to da je često potrebno lipide ukloniti iz ekstrakta da bi se ekstrakt mogao analizirati metodom hromatografije. Sadržaj lipida u ribi (u mg/kg mokre težine) na kraju ispitivanja ne sme da se razlikuje za više od ± 25% u odnosu na sadržaj na početku ispitivanja. Navodi se i procenat suve materije tkiva da bi se omogućila konverzija vrednosti koncentracije lipida u funkciji sveže mase u koncentraciju lipida u funkciji suve mase.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Kriva unosa za ispitivanu supstancu dobija se grafičkim prikazom koncentracije ispitivane supstance u ili na ribi (ili određenim tkivima) u fazi unosa u funkciji vremena. Ako je kriva dostigla plato, odnosno ako je postala približno paralelna sa x-osom, BCFSS se izračunava formulom:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| BCFSS = | Cf kao ravnotežno stanje (srednja vrednost) |  |
| Cw kao ravnotežno stanje (srednja vrednost) |  |

Kad se ne dostigne ravnotežno stanje, moguće je izračunati BCFSS koji je dovoljno precizan za procenu rizika iz ravnotežnog stanja kao 80% (1,6/k2) ili 95% (3,0/k2) ekvilibrijuma.

Određuje se i BCFK kao odnos k1/k2, dve konstante kinetike prvog reda. Konstanta brzine eliminacije (k2) obično se određuje iz krive eliminacije (odnosno grafičkog prikaza smanjenja koncentracije ispitivane supstance u ribi u funkciji vremena). Zatim se izračunava konstanta brzine unosa (k1) s obzirom na k2 i vrednost Cf koja se određuje iz krive unosa (videti Deo šesti ove metode). Najbolji postupak za određivanje vrednosti BCFK i konstantni k1 i k2 je upotrebom računara korišćenjem metoda za procenu nelinearnih parametara**11**. Koristi se i grafički metod za izračunavanje k1 i k2. Ako kriva eliminacije očigledno nije kriva kinetike prvog reda, upotrebljavaju se složeniji modeli (videti literaturu u Delu četvrtom ove metode) i traži savet statističara.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Treba biti oprezan prilikom tumačenja rezultata ispitivanja kada se izmerene koncentracije ispitivane supstance nalaze blizu limita detekcije primenjene analitičke metode.

Jasno definisane krive unosa i eliminacije su indikatori dobrog kvaliteta podataka. Razlika između vrednosti konstanti unosa/eliminacije za dve primenjene koncentracije ispitivane supstance je manje od 20%. U izveštaju o ispitivanju navode se i objašnjavaju opažene značajne razlike u brzinama unosa/eliminacije za dve primenjene koncentracije ispitivane supstance. Uobičajeno, intervali poverenja za vrednosti BCF iz dobro osmišljenog i izvedenog ispitivanja iznose oko ± 20%.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj sadrži podatke o:

1. ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda i ukoliko je relevantno, fizička i hemijska svojstva;

- podaci o hemijskoj identifikaciji (uključujući sadržaj organskog ugljenika, ukoliko je prikladno);

- ukoliko se ispituju obeležene supstance, tačan položaj radioaktivno obeleženih atoma i procenat radioaktivnosti povezan sa nečistoćama;

2. vrstama koje se koriste u ispitivanju:

- latinski naziv, soj, poreklo, prethodni tretmani (ukoliko ih je bilo), aklimatizacija, uzrast, veličina jedinki, itd.

3. uslovima ispitivanja:

- primenjeni uslovi ispitivanja (npr. protočni ili semi-statički);

- tip i svojstva primenjenog osvetljenja i trajanje fotoperioda;

- postavka ispitivanja (npr. broj i veličina akvarijuma, dinamika izmene medijuma u akvarijumima, broj ponavljanja, broj jedinki riba po ponavljanju, broj koncentracija ispitivane supstance, dužina trajanja faza unosa i eliminacije, učestalost uzimanja uzoraka ribe i vode);

- postupak pripreme osnovnih rastvora i učestalost izmene (ukoliko se koristi rastvarač za povećanje rastvorljivosti ispitivane supstance, navodi se koji rastvarač, njegova koncentracija i doprinos sadržaju ukupnom organskog ugljenika u medijumu);

- nominalne koncentracije ispitivane supstance, srednje vrednosti i standardne devijacije koncentracija izmerenih u akvarijumima i postupak kojim su određene;

- izvor vode za razblaživanje, opis svake prethodne obrade, rezultati bilo kog ispitivanja koji potvrđuje da jedinke ribe mogu da žive u toj vodi, kao i svojstva vode: pH vrednost, tvrdoća, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, rezidijumi hlora (ukoliko je mereno), ukupni organski ugljenik, suspendovane materije, salinitet mediuma (ukoliko je primereno) i rezultati svih merenja koja su urađena u toku ispitivanja;

- kvalitet vode u akvarijumima, pH vrednost, tvrdoća, TOC, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika;

- detaljni podaci o hranjenju (npr, vrsta hrane, poreklo, sastav - ako je moguće, bar sadržaj lipida i proteina, količina hrane i učestalost hranjenja);

- podaci o obradi uzoraka ribe i vode, uključujući detalje o pripremi, čuvanju, ekstrakciji i analitičkim metodama (i preciznost) primenjenim na ispitivanoj supstanci i sadržaj lipida ukoliko je meren).

4. rezultatima:

- rezultati svakog preliminarnog ispitivanja;

- smrtnost u kontrolnim i u svim ispitivanim grupama, kao i svako uočeno abnormalno ponašanje;

- sadržaj lipida u jedinkama ribe (ukoliko je određivano u toku ispitivanja);

- krive (uključujući sve podatke merenja) koje pokazuju unos i eliminaciju ispitivane supstance iz ribe i vreme do uspostavljanja ravnotežnog stanja;

- Cf i Cw (sa standardnom devijacijom i intervalima poverenja, ukoliko je primereno) za sva uzorkovanja (Cf izražen u mg/g mokre težine (ppm) cele ribe ili određenih tkiva ribe, npr. lipida, i Cw u mg/g (ppm). Cw vrednosti za kontrolu (vrednost fona se takođe navodi);

- BCFSS, odnosno BCFK, ukoliko je primenljivo, 95% intervali poverenja za konstante brzina unosa i eliminacije (sve izražene u odnosu na celu ribu, i ukupni sadržaj lipida ukoliko je izmeren, ribe ili određenih tkiva ribe), intervala poverenja i standardne devijacije (ukoliko se raspolaže tim podacima) i postupci izračunavanja/analize podataka za svaku koncentraciju ispitivane supstance;

- ako su korišćene obeležene supstance i ukoliko je zahtevano, može se prikazati akumulacija svih detektovanih metabolita;

- sva neobična opažanja u toku ispitivanja, sva odstupanja od ovde opisanih postupaka i sve ostale relevantne informacije;

Rezultati ispod limita detekcije ne koriste se za izračunavanje konstanti brzina.

**4. LITERATURA**

1. Connell D.W. (1988) Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, p. 117-156.

2. Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993) Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, p. 29-390.

3. OECD, Paris (1996) Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

4. Kristensen P. (1991) BioCOncentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

5. US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

6. US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

7. US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8. Compaan H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

9. Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, p. 1099-1105.

10. Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, p. 1431-1436.

11. CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

12. ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard

**Deo drugi**

**HEMIJSKA SVOJSTVA ODGOVARAJUĆE VODE ZA RAZBLAŽIVANJE**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Parametar | Granična koncentracija |
| 1 | Suspendove materije | 5 mg/l |
| 2 | Ukupni organski ugljenik | 2 mg/l |
| 3 | Nejonizovani amonijak | 1 μg/l |
| 4 | Rezidijumi hlora | 10 μg/l |
| 5 | Ukupni organofosforni pesticidi | 50 ng/l |
| 6 | Ukupni organohlorni pesticidi plus PCB | 50 ng/l |
| 7 | Ukupni organski hlor | 25 ng/l |
| 8 | Aluminijum | 1 μg/l |
| 9 | Arsen | 1 μg/l |
| 10 | Hrom | 1 μg/l |
| 11 | Kobalt | 1 μg/l |
| 12 | Bakar | 1 μg/l |
| 13 | Gvožđe | 1 μg/l |
| 14 | Olovo | 1 μg/l |
| 15 | Nikl | 1 μg/l |
| 16 | Cink | 1 μg/l |
| 17 | Kadmijum | 100 ng/l |
| 18 | Živa | 100 ng/l |
| 19 | Srebro | 100 ng/l |

**Deo treći**

**PREPORUČENE VRSTE RIBA ZA ISPITIVANJA**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Preporučene vrste | | Preporučeni opseg temperatura (°C) | Preporučena ukupna dužina jedinki (cm) |
| 1 | *Danio rerio***IX** (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan), zebrica | 20 - 25 | 3,0 ± 0,5 |
| 2 | *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) | 20 - 25 | 5,0 ± 2,0 |
| 3 | *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus), šaran | 20 - 25 | 5,0 ± 3,0 |
| 4 | *Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) | 20 - 25 | 4,0 ± 1,0 |
| 5 | *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), gupi | 20 - 25 | 3,0 ± 1,0 |
| 6 | *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) | 20 - 25 | 5,0 ± 2,0 |
| 7 | Oncorhynchus *mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), kalifornijska pastrmka | 13 - 17 | 8,0 ± 4,0 |
| 8 | *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) koljuška | 18 - 20 | 3,0 ± 1,0 |

Različite estuarske i morske vrste riba koje se koriste u drugim zemljama su: *Leiostomus xanthurus, Cyprinodon variegatus, Menidia beryllina, Cymatogaster aggregata, Parophrys vetulus, Leptocottus armatus, Gasterosteus aculeatus, Dicentracus labrax* i *Alburnus alburnus.*

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**IX** Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

PRIKUPLJANJE

Navedene vrste riba lako se razmnožavaju i uzgajaju. U mnogim delovima sveta ove vrste riba mogu se nabaviti u toku cele godine. Kako su navedene vrste pogodne i za uzgajanje u laboratorijskim uslovima, zdravstveno stanje i poreklo jedinki koje se koriste za ispitivanje je, uz kontrolu prisustva parazita i bolesti, uvek poznato.

**Deo četvrti**

**PREDVIĐANJE TRAJANJA FAZA UNOSA I ELIMINACIJE**

1. PREDVIĐANJE TRAJANJA FAZE UNOSA

Pre izvođenja ispitivanja, procena k2 i procena vremena potrebnog da se uspostavi ravnotežno stanje može se dobiti iz empirijskih odnosa između vrednosti k2 i koeficijenta raspodele u sistemu *n*-oktanol/voda (Pow) ili k2 i rastvorljivosti u vodi ispitivane supstance (s).

Procena k2 (dan-1) može se dobiti, npr. iz sledeće empirijske jednačine**1**:

log10k2 = -0.414×log10(Pow)+1.47×(r2 = 0.95) (jednačina 1)

Za ostale jednačine videti u literaturi**2**.

Ako podeoni koeficijent (Pow) nije poznat, može se napraviti procena**3** na osnovu poznavanja rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi koristeći jednačinu:

log10Pow = 0.862×log10(s)+0.710×(r2 = 0.994) (jednačina 2)

pri čemu:

*s* jeste rastvorljivost (mol/l) : (*n*=36)

Ovi odnosi važe samo za supstance sa vrednostima log Pow između 2 i 6,5**4**.

Vreme potrebno da se postigne određeni procenat ravnotežnog stanja može se dobiti iz opšte kinetičke jednačine koja opisuje unos i eliminaciju (kinetika prvog reda):

|  |  |
| --- | --- |
| dCf | = k1 x Cw - k2 x Cf |
| dt |

ili ako je vrednost Cw konstantna:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Cf = | k1 | x Cw (1 - e-k2t) | (jednačina 3) |
| k2 |

Kad se približava dostizanje ravnotežnog stanja (t®¥), jednačina 3 može se svesti**5, 6** na:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Cf = | k1 | x Cw |
| k2 |

ili

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Cf | = | k1 | = BCF |
| Cw | k2 |

Onda se iz izraza k1/k2×Cw može odrediti koncentracija ispitivane supstance u ribi pri ravnotežnom stanju (Cf,s).

Jednačina 3 može se pretvoriti u:

Cf = Cf,s x (1 - e-k2t)

ili

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Cf | 1 - e-k2t | (jednačina 4) |
| Cf,s |

Primenom jednačine 4, vreme da se dostigne određeni procenat ravnotežnog stanja može se predvideti kad se k2 prethodno odredi koristeći jednačine 1 ili 2.

Kao smernica, statistički optimalno trajanje faze unosa za dobijanje statistički prihvatljivih podataka (BCFK) jeste period potreban da kriva koja predstavlja log-transformisane podatke za koncentraciju ispitivane supstance u funkciji vremena dostigne srednju tačku, ili 1,6/k2, ili 80% ravnotežnog stanja, ali ne više od 3,0/k2 ili 95% ravnotežnog stanja**7**.

Vreme potrebno da se dostigne 80% ravnotežnog stanja je (jednačina 4):

0,80 = 1 - e - K2t80

ili

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| t80 = | 1,6 | (jednačina 5) |
| k2 |

Slično tome, vreme potrebno za dostizanje 95% ravnotežnog stanja je:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| t95 = | 3,0 | (jednačina 6) |
| k2 |

Na primer, trajanje faze unosa (up) za ispitivanu supstancu sa log (Pow) = 4 bilo bi (primenom jednačina 1, 5 i 6):

log10k2 = -0,414.(4)+1,47

k2 = 0,652 dana-1

up (80%) = 1,6/0,652 odnosno 2,45 dana (59 sati)

ili

up (95%) = 3,0/0,652 odnosno 4,6 dana (110 sati)

Slično tome, za ispitivanu supstancu sa s = 10-5 mol/L (log (s) = -5,0), trajanje faze unosa bilo bi (primenom jednačina 1,2,5,6):

log10(Pow) = -0,862(-5,0)+0,710 = 5,02

log10k2 = -0,414.(4)+1,47

k2 = 0,246 dana-1

up (80%) = 1,6/0,246 odnosno 6,5 dana (156 sati)

ili

up (95%) = 3,0/0,246 odnosno 12,2 dana (293 sata)

Alternativno tome, izraz:

teq = 6,54 × 10-3 Pow + 55,31 (sati)

može se koristiti da se izračuna vreme potrebno za dostizanje efektivnog ravnotežnog stanja**4**.

**2. PREDVIĐANJE TRAJANJA FAZE ELIMINACIJE**

Predviđanje vremena potrebnog da se smanji koncentracija ispitivane supstance u organizmu koji se koristi u ovoj metodi do određenog procenta početne koncentracije može se dobiti iz opšte jednačine koja opisuje unos i eliminaciju (kinetika prvog reda)**1, 8**.

Za fazu eliminacije, pretpostavlja se da je vrednost Cw nula. Jednačina se može redukovati na:

|  |  |
| --- | --- |
| dCf | = - k2 Cf |
| dt |

ili

Cf = Cf,o × e - K2t

pri čemu

Cf,0 jeste koncentracija na početku perioda eliminacije.

Eliminacija od 50% postiže se u vremenu t50:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Cf | = | 1 | e-K2t50 |
| Cf,o | 2 |

ili

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| t50 = | 0,693 |  |
| k2 |  |

Slično tome, 95% eliminacija postiže se pri:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| t95 = | 3,0 |  |
| k2 |  |

Ako se koristi 80% unosa za prvi period (1,6/k2) i 95% gubitka u fazi eliminacije (3,0/k2), onda faza eliminacije traje približno dva puta duže od faze unosa.

Ove procene se zasnivaju na pretpostavci da se procesi unosa i eliminacije mogu opisati kao kinetika prvog reda. Ukoliko se ne ponašaju po modelu kinetike prvog reda, koriste se složeniji modeli1.

**LITERATURA**

1. Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioConcentration of organics in fish. Environ. ToxiCol. and Chem. 1, pp 309-320.

2. Kristensen P. (1991) BioConcentration in fish: Comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

3. Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic Compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10.

4. Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition Coefficient of lipophilic Compounds on bioConcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.

5. Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

6. Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

7. Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

8. Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) ToxiCokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

**Deo peti**

**PRIMER UZORKOVANJA ZA ISPITIVANJE BIOKONCENTRACIJE ZA SUPSTANCE SA LOG Pow = 4**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Uzorkovanje riba | Raspored uzimanja uzoraka | | Broj uzoraka vode | Broj jedinki riba po uzorku |
| Najmanja potrebna učestalost (u danima) | Dodatno uzimanje uzoraka |
| Faza unosa | -10 |  | 2**X** 2 | dodati 45-80 riba |
| 1. | 0,3 | 0,4 | 2 (2) | 4 (4) |
| 2. | 0,6 | 0,9 | 2 (2) | 4 (4) |
| 3. | 1,2 | 1,7 | 2 (2) | 4 (4) |
| 4. | 2,4 | 3,3 | 2 (2) | 4 (4) |
| 5. | 4,7 |  | 2 | 6 |
| Faza  eliminacije |  |  |  | Prenos jedinki u akvarijum sa čistim medijumom |
| 6. | 5,0 | 5,3 |  | 4 (4) |
| 7. | 5,9 | 7,0 |  | 4 (4) |
| 8. | 9,3 | 11,2 |  | 4 (4) |
| 9. | 14,0 | 17,5 |  | 6 (4) |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**X** Uzorak vode nakon minumum tri zamene kompletne zapremine akvarijuma. Vrednosti u zagradama su broj uzoraka (vode, riba) koji će se uzeti ukoliko je potrebno dodatno uzorkovanje.

Napomena: Prethodna procena k2 za log Pow od 4,0 je 0,652 dana-1. Ukupno trajanje ispitivanja postavljeno je na 3 × up = 3 4,6 dana, odnosno 14 dana. Za procenu "up" videti Deo četvrti ove metode.

**Deo šesti**

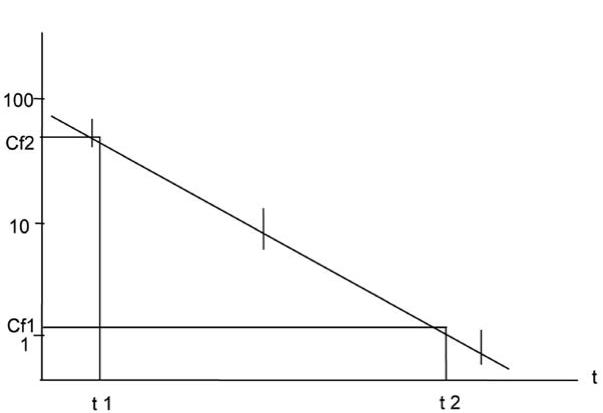
**IZBOR MODELA**

Većina podataka dobijenih iz ispitivanja biokoncentracije može se dobro opisati pomoću jednostavnog dvoparametarskog modela, što se vidi iz linearizovane krive za vrednosti koncentracija ispitivane supstance u ribi u toku faze eliminacije, kad se grafički prikaže na semi-logaritamskom papiru (kada se ova kriva ne može linearizovati, upotrebljavaju se složeniji modeli**1**).

Grafički postupak za određivanje konstante brzine eliminacije (gubitka) k2

Koncentracija ispitivane supstance izmerena u svakom uzorku ribe grafički se prikazuje u funkciji vremena uzimanja uzorka na semi-logaritamskom papiru. Nagib te prave je k2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| k2 = | 1n(Cf1 /Cf2) |  |
| t1 - t2 |  |



Napomena: Odstupanja od prave linije mogu ukazivati na to da se proces eliminacije ponaša po modelu koji je složeniji od kinetike prvog reda.

Grafički postupak može se primeniti za određivanje konstante brzine eliminacije kada dati proces odstupa od modela kinetike prvog reda.

Grafički postupak za određivanje konstante brzine unosa k1

Kad je poznata vrednost k2, k1 se izračunava na sledeći način:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| k1 = | Cfk2 |  | |
| Cw x (1 - e-k2t) |  | (jednačina 1) |

Vrednost Cf očitava se iz srednje tačke platoa krive unosa koja se dobija kad se log-transformisani podaci za koncentraciju grafički prikažu u funkciji vremena.

Kompjuterski postupak za izračunavanje konstanti brzina unosa i eliminacije (gubitka)

Najbolji način određivanja faktora biokoncentracije i konstante brzina k1 i k2 jeste da se koriste računar i metoda procene nelinearnih parametara. Ovakvi kompjuterski programi izračunavaju vrednosti za k1 i k2 na osnovu niza podataka o koncentracijama ispitivane supstance i sledećeg modela:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s154.gif | 0  t  tc | jednačina 2 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s155.gif | t  tc | jednačina 3 |

pri čemu:

tc jeste vreme na kraju faze unosa.

Ovakav pristup omogućava određivanje standardne devijacije za k1 i k2.

U većini slučajeva k2 se može proceniti iz krive eliminacije sa relativno visokom preciznošću, pa s obzirom na to da postoji jaka korelacija između parametara k1 i k2, ako se procenjuju istovremeno, savetuje se da se prvo izračuna k2 samo iz podataka iz faze eliminacije, a nakon toga da se izračuna k1 iz podataka iz faze unosa pomoću nelinearne regresione analize.

**C.14. ISPITIVANJE RASTA RIBLJE MLAĐI**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 215 (2000).

*1.1. Uvod*

Metoda ispitivanja osmišljena je za procenu efekta na rast nakon produženog izlaganja riblje mlađi hemikalijama. Bazira se na metodi, koja je razvijena i ispitana međulaboratorijskim ispitivanjem**1,2**, za procenu efekta hemikalija na rast riblje mlađi kalifornijske pastrmke u protočnim uslovima. Mogu se koristiti i druge dobro opisane vrste. Postoje iskustva sa ispitivanjem rasta vrste *Daniorerio***XI** (zebrica)**3,4** i *Oryziaslatipes***5,6,7**.

Videti i opšti uvod Priloga 3.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XI** Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

*1.2. DEFINICIJE*

Najniža koncentracija koja dovodi do značajnih efekata (u daljem tekstu: LOEC) jeste najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj je opažen značajan učinak (pri p < 0,05) u poređenju sa kontrolom. Sve ispitivane koncentracije iznad LOEC potrebno je da imaju štetne efekte jednake ili veće od onih opaženih pri LOEC.

Koncentracija koja ne dovodi do značajnog efekta (u daljem tekstu: NOEC) jeste koncentracija neposredno ispod LOEC.

ECx u ovoj metodi ispitivanja jeste koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do x% promene u brzini rasta ribe u poređenju sa kontrolama.

Nasad jeste sveža masa riba po zapremini vode.

Gustina nasada jeste broj jedinki riba po zapremini vode.

Specifična brzina rasta pojedine ribe jeste brzina rasta jedinke u odnosu na njenu početnu težinu.

Prosečna specifična brzina rasta po komori za ispitivanje jeste srednja brzina rasta populacije riba u akvarijumu u jednom tretmanu (koncentraciji).

Pseudospecifična brzina rasta jeste pojedinačna brzina rasta u poređenju sa srednjom vrednošću početne težine populacije riba u akvarijumu.

*1.3. PRINCIP METODE*

Riblja mlađ u ekponencijalnoj fazi rasta se nakon merenja stavlja u komore za ispitivanje i izlaže opsegu subletalnih koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi ako je moguće u protočnim uslovima, ili ukoliko to nije moguće, u odgovarajućim polustatičnom sistemu (uz potpuno periodično obnavljanje ispitivanog medijuma). Ispitivanje traje 28 dana. Riba se svakodnevno hrani. Količina hrane određuje se na osnovu početne težine ribe i može se proračunati nakon 14 dana. Riba se ponovno meri na kraju ispitivanja. Efekti na stopu rasta analiziraju se pomoću regresionog modela da bi se procenila koncentracija koja je dovela do x% promene u stopi rasta, tj. ECx (npr. EC10, EC20, ili EC30). Alternativno, podaci se mogu porediti sa kontrolnim vrednostima da bi se odredila najniža koncentracija koja dovodi do značajnog efekta, a zatim i koncentracija koja ne dovodi do značajnog efekta.

*1.4. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Treba imati podatke o akutnoj toksičnosti (videti metodu ispitivanja C.1. koja je data u ovom pravilniku) iz ispitivanja urađenom, ako je moguće, na istoj vrsti riba. To znači da je poznata rastvorljivost u vodi i napon pare ispitivane supstance i da postoji pouzdani analitički postupak za kvantifikaciju supstance u rastvoru sa poznatom i dokumentovanom preciznošću i granicom detekcije.

Korisni podaci su i strukturne formule, čistoća supstance, stabilnost u vodi i na svetlu, pKa, Pow i rezultati ispitivanja brze biorazgradljivosti (videti metodu ispitivanja C.4. koja je data u ovom pravilniku).

*1.5. PRIHVATLJIVOST ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, potrebno je ispuniti uslove:

- smrtnost u kontrolama ne premašuje 10% na kraju ispitivanja,

- porast srednje težine riba iz kontrolne grupe je dovoljan da omogući detekciju minimalne varijacije stope rasta koja se smatra značajnom. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja**2** sa kalifornijskom pastrmkom pokazali su da se u toku 28 dana srednja vrednost težine ribe u kontrolama poveća najmanje za polovinu (odnosno 50%) srednje vrednosti njihove početne težine; npr. 1 g/riba (= 100%), konačna težina nakon 28 dana: > 1,5 g/riba (> 150%);

- koncentracija rastvorenog kiseonika je najmanje 60% vrednosti zasićenja vazduha (air saturation value, u daljem tekstu: ASV) u toku čitavog ispitivanja;

- temperatura vode u ispitivanim akvarijumima međusobno se ne razlikuje za više od ± 1° C u bilo kom trenutku u toku ispitivanja i održava se unutar opsega ± 2° C u okviru preporučenog opsega temperature za ispitivanu vrstu (videti Deo drugi ove metode).

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Oprema**

U ovoj metodi ispitivanja koristi se uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

- oksimetar i pH-metar;

- oprema za određivanje tvrdoće vode i alkaliteta;

- odgovarajuća oprema za kontrolu temperature i ako je moguće kontinuirani nadzor;

- komore za ispitivanje od hemijski inertnog materijala i pogodnog kapaciteta shodno preporučenom nasadu i gustini nasada (videti odeljak 1.8.5. i Deo drugi ove metode);

- precizna vaga (tačnost ± 0,5%).

**1.6.2. Voda**

U ispitivanju se koristi svaka voda u kojoj ispitivana vrsta pokazuje zadovoljavajuće preživljavanje i rast u dužem vremenskom periodu. Voda da bude stalnog kvaliteta u toku čitavog trajanja ispitivanja. Vrednost pH vode da bude unutar opsega od 6,5 do 8,5 i u toku svakog konkretnog ispitivanja da bude unutar opsega od ± 0,5 pH jedinica. Preporučuje se tvrdoća iznad 140 mg/l CaCO3). Da bi se predupredio prekomeran uticaj vode za razblaživanje na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance), uzimati uzorke za analizu u određenim intervalima. Sadržaj teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO4), pesticida (ukupni organofosforni i organohlorni pesticidi) ukupnog organskog ugljenika i suspendovanih materija odrediti svaka tri meseca ako se zna da je voda za razblaživanje relativno stalnog kvaliteta. Ako je voda pokazala konstantan kvalitet u toku prethodnih godinu dana, analize se rade ređe, a intervali su duži (svakih 6 meseci). Neka prihvatljiva hemijska svojstva vode za razblaživanje navedena su u Delu drugom ove metode.

**1.6.3. Rastvori ispitivanih supstanci**

Rastvori odabranih koncentracija test supstance pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora.

Osnovni rastvor bi, ako je moguće, trebalo pripremiti jednostavnim mešanjem ili mućkanjem ispitivane supstance u vodi mehaničkim putem (npr. mešanjem ili ultrazvučno). Za pripremu odgovarajućeg koncentrovanog osnovnog rastvora mogu se koristiti kolone zasićenja (kolone rastvorljivosti).

U nekim slučajevima je potrebno korišćenje rastvarača ili disperzionog sredstva (sredstva za povećanje rastvorljivosti) da bi se pripremio osnovni rastvor odgovarajuće koncentracije. U pogodne rastvarače ubrajaju se aceton, etanol, metanol, dimetilsulfoksid, dimetilformamid i trietilenglikol. Pogodna sredstva za disperziju su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Potreban je oprez pri korišćenju lako biorazgradljivih sredstava (npr. acetona), odnosno visoko isparljivih jedinjenja, jer mogu stvoriti probleme sa povećanjem broja bakterija u protočnim uslovima. Ako se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, ono ne sme imati značajne efekte na rast riba ni vidljive štetne efekte na riblju mlađ, što se može utvrditi kontrolnim tretmanom u kome se ribe izlažu samo dejstvu rastvarača.

Kod ispitivanja u protočnim uslovima potreban je sistem koji kontinuirano otpušta i razređuje osnovni rastvor ispitivane supstance (npr. merna pumpa, sistem za proporcionalno razblaživanje, sistem za regulaciju zasićenja) da bi se u ispitivane akvarijume dostavila serija različitih koncentracija. Tokom ispitivanja, protok osnovnih rastvora i vode za razblaživanje proverava se u određenim intervalima, ako je moguće svakog dana, i ne varira više od 10% u toku čitavog ispitivanja. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja**2** pokazali su da je 6 L po gramu ribe na dan prihvatljiva učestalost uklanjanja vode za kalifornijsku pastrmku u toku ispitivanja (videti odeljak 1.8.2.2. ove metode).

Kod ispitivanja u polustatičnom sistemu (sa kompletnim periodičnim obnavljanjem medijuma), učestalost obnavljanja medijuma zavisi od stabilnosti ispitivane supstance, ali se preporučuje dnevno obnavljanje. Ako preliminarna ispitivanja stabilnosti (videti odeljak 1.4. ove metode) pokažu da koncentracija ispitivane supstance nije stalna (odnosno nalazi se izvan opsega 80% do 120% nominalne koncentracije ili pada ispod 80% izmerene početne koncentracije) u toku perioda obnove, ispitivanje uraditi u protočnom sistemu.

**1.6.4. Izbor vrste za ispitivanje**

Za ispitivanje se preporučuje kalifornijska pastrmka, jer je na ovoj vrsti **1,2** dobijeno najviše podataka u međulaboratorijskim ispitivanjima. Koriste se i druge dobro opisane vrste, ali se u tom slučaju postupak ispitivanja prilagođava da bi se stvorili pogodni uslovi ispitivanja. Postoje iskustva sa ispitivanjem rasta vrste *Daniorerio* (zebrica)3,4 i *Oryziaslatipes*5,6,7. Kada se u ispitivanju koriste druge vrste, navodi se razlog za njihov izbor, kao i za izbor metode ispitivanja.

**1.6.5. Uzgoj ribe**

Jedinke se biraju iz populacije riba iz istog uzgoja, ako je moguće iz istog mresta i uzgajaju najmanje dve nedelje pre ispitivanja u uslovima sličnim onima koji se koriste u ispitivanju, prvenstveno u pogledu kvaliteta vode i osvetljenja. Riba se hrani minimalnim obrocima koji iznose 2% telesne težine dnevno, a ako je moguće 4% telesne težine dnevno u toku celog perioda uzgoja i ispitivanja.

Nakon 48 sati privikavanja, zapisuje se kolika je smrtnost i primenjuju se kriterijumi:

- ako je smrtnost iznad 10% populacije u roku od 7 dana, čitava serija se odbacuje;

- ako je smrtnost između 5% i 10% populacije, riba se aklimatizuje dodatnih 7 dana;

- ako je smrtnost veća od 5% u toku sledećih 7 dana, čitava serija se odbacuje;

- ako je smrtnost manja od 5% populacije u 7 dana, prihvata se čitava serija.

Dve nedelje pre, kao ni u toku ispitivanja riba se ne sme lečiti od bolesti.

*1.7. POSTAVKA ISPITIVANJA*

"Postavka ispitivanja" odnosi se na izbor broja i razmaka u seriji ispitivanih koncentracija, broj akvarijuma sa svakom pojedinom koncentracijom i broj riba po akvarijumu. U idealnom slučaju, ispitivana postavka se bira na osnovu:

- cilja ispitivanja;

- statističke analize koja će se koristiti;

- raspoloživosti i cene ispitivanja resursa.

U opisu cilja ispitivanja precizirati statističku snagu pri kojoj je potrebno odrediti minimalnu statistički značajnu razliku izabranog parametra (npr. brzina rasta) ili zahtevanu preciznost pri proceni ECx (npr. sa x = 10, 20 ili 30, ako je moguće ne manji od 10). Bez toga se ne može tačno preporučiti obim ispitivanja.

Postupak ispitivanja koji je optimalan (jer najbolje iskorišćava resurse) pri primeni jedne metode statističke analize, nije nužno optimalan za drugu vrstu statističke analize. Preporučeni postupak ispitivanja za procenu LOEC/NOEC nije isti kao postupak koji se preporučuje za regresionu analizu.

U većini slučajeva, regresiona analiza ima prednost nad analizom varijanse**8**. Kad se ne može pronaći odgovarajući regresijski model (p2 < 0,9) koristi se NOEC/LOEC.

**1.7.1. Postavka ispitivanja za regresionu analizu**

Pri postavci ispitivanja čiji će rezultati biti analizirani regresionim modelima uzeti u obzir aspekte:

- efektivna koncentracija (npr. EC10,20,30) i opseg koncentracija u kom se javlja efekat ispitivane supstance koji nas zanima nalazi se unutar opsega koncentracija koje se primenjuju u ispitivanju. Najveća preciznost kojom se procenjuje efektivna koncentracija postiže se kad se efektivna koncentracija nalazi u sredini opsega koncentracija koje se koriste u ispitivanju. Preliminarno ispitivanje u cilju određivanja opsega koncentracija pomaže u izboru odgovarajuće serije ispitivanih koncentracija;

- postavlja se najmanje jedna kontrolna i pet dodatnih komora za ispitivanje sa različitim koncentracijama da bi se omogućilo zadovoljavajuće statističko modelovanje. U slučajevima kad se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, uz seriju akvarijuma sa ispitivanom supstancom potrebno je postaviti jednu kontrolu koja sadrži sredstvo za povećanje rastvorljivosti u najvišoj test koncentraciji (videti odeljke 1.8.3. i 1.8.4. ove metode);

- mogu se koristiti odgovarajući geometrijske ili logaritamske serije9 (videti Deo četvrti ove metode). Prednost se daje logaritamskoj raspodeli koncentracija ispitivane supstance;

- ako je na raspolaganju više od šest komora za ispitivanje, dodatne se koriste za ponavljanje, ili se raspodeljuju unutar opsega koncentracija ispitivane supstance, kako bi razlika između pojedinih koncentracija bila manja. Obe mere su podjednako dobre.

**1.7.2. Postavka ispitivanja za procenu NOEC/LOEC pomoću analize varijanse (ANOVA)**

Za svaku ispitivanu koncentraciju, ako je moguće, postaviti po dve komore za ispitivanje sa istom koncentracijom ispitivane supstance, a statistička analiza se radi na nivou komore**10**. Ako se ne koriste ponavljanja (replike), ne sme postojati nikakva varijabilnost između komora za ispitivanje osim varijabilnosti na nivou jedinki. Iskustvo je pokazalo**11** da je u konkretnom slučaju varijabilnost između komora bila vrlo mala u poređenju sa varijabilnošću unutar komora (tj. između jedinki u jednoj komori), pa je statistička analiza koja se radi na nivou jedinke u testu relativno prihvatljiva alternativa.

Obično se koristi najmanje pet test koncentracija u geometrijskoj seriji sa faktorom koji ako je moguće nije veći od 3,2.

Kada se izvodi ispitivanje u duplikatu, broj replika kontrolne grupe, samim tim i broj riba, je dvostruko veći od broja koji se koristi za svaku ispitivanu koncentraciju, a koje su iste veličine**12,13,14**. Kad nema replika, broj jedinki u kontrolnoj grupi je isti kao i broj jedinki za svaku ispitivanu koncentraciju.

Ako se analiza varijanse (Analysis of Variance, u daljem tekstu: ANOVA) radi na nivou komore, a ne na bazi jedinke, što povlači označavanje pojedinih riba ili upotrebu pseudo specifičnih brzina rasta (videti odeljak 2.1.2. ove metode), postaviti dovoljan broj duplikata komora da bi se omogućilo određivanje standardne devijacije između komora unutar ispitivane koncentracije. To znači da stepeni slobode**10** za grešku u analizi varijanse iznose najmanje 5. Ako se postave samo duplikati kontrola, postoji opasnost od pomaka varijabilnosti greške, jer se ona može povećavati kako se povećava srednja vrednost brzine rasta. S obzirom na to da će se brzina rasta najverovatnije smanjivati sa povećanjem koncentracije, postoji mogućnost da se varijabilnost preceni.

*1.8. POSTUPAK*

**1.8.1. Izbor i merenje ispitivanih jedinki riba**

Važno je svesti na minimum varijacije u težini ribe na početku ispitivanja. Odgovarajući opseg veličine za različite vrste riba preporučene za upotrebu u ovoj metodi ispitivanja navedeni su u Delu drugom ove metode. Za čitavu seriju jedinki riba upotrebljenih u ispitivanju, težina jedinki na početku ispitivanja u idealnom slučaju je unutar opsega od ± 10% aritmetičke sredine težine i ni u kom slučaju ne premašuje 25%. Preporučuje se merenje poduzorka jedinki riba pre ispitivanja da bi se procenila srednja težina.

Populacija ribe iz istog uzgoja namenjena za ispitivanje ne hrani se 24 sata pre ispitivanja. Jedinke se zatim biraju slučajnim izborom. Primenom opšte anestezije (npr. vodeni rastvor 100 mg/l trikain-metan sulfonata (MS 222) neutralisanog dodatkom dva dela natrijum-bikarbonata na jedan deo MS 222), svaka jedinka se izmeri i odredi joj se sveža masa (riba se prethodno obriše da se ukloni suvišna voda) sa tačnošću koja je navedena u Delu drugom ove metode. Ribe čija se telesna težina nalazi unutar odabranog opsega zadrže se i zatim nasumično raspoređuju u komore za ispitivanje. Zapisuje se ukupna sveža masa riba u svakoj komori. Upotreba anestetika kao i manipulacija ribom (uključujući brisanje i merenje) može prouzrokovati stres i ozlede riblje mlađi, posebno kod vrsta riba koje su male veličine. Ribljom mlađi se rukuje pažljivo da bi se izbegao stres i povreda životinja uključenih u ispitivanje.

Riba se ponovno meri 28. dana ispitivanja (videti odeljak 1.8.6. ove metode). Ako se smatra da je neophodno preračunati količinu hrane, riba se može ponovno meriti i 14. dana ispitivanja (videti odeljak 1.8.2.3. ove metode). Za određivanje promene u veličini ribe prema kojoj će se prilagoditi obroci hrane mogu se koristiti i drugi postupci, kao što je fotografska metoda.

**1.8.2. Uslovi izlaganja**

*1.8.2.1. Dužina*

Ispitivanje traje ≥ 28 dana.

*1.8.2.2. Nasad i gustina nasada*

Važno je da nasad i gustina nasada odgovaraju vrsti riba koja se koristi u ispitivanju (videti Deo drugi ove metode). Ako je gustina nasada previsoka, nastupiće stres zbog prenaseljenosti, koji može prouzrokovati smanjene brzine rasta i stvoriti mogućnost za razvoj bolesti. Ako je gustina nasada preniska, može izazvati teritorijalno ponašanje u riba, koje može da utiče na rast. Nasad je dovoljno nizak da se koncentracija rastvorenog kiseonika može održavati bez aeracije na nivou od najmanje 60% ASV. Međulaboratorijsko ispitivanje pokazalo je da prihvatljiva gustina nasada za kalifornijsku pastrmku iznosi 16 jedinki od 3 g do 5 g na zapreminu od 40 litara. Preporučena učestalost uklanjanja vode u toku ispitivanja je 6 L po gramu ribe na dan.

*1.8.2.3. Ishrana*

Riba se hrani odgovarajućom vrstom hrane (videti Deo drugi ove metode) i zadovoljavajućom količinom hrane koja omogućava prihvatljivu brzinu rasta. Ne sme doći do rasta mikroorganizama i zamućivanja vode. Za kalifornijsku pastrmku, brzina od 4% njihove telesne težine po danu verovatno će zadovoljiti ove uslove**2,15,16,17**. Dnevni obrok može da se podeli u dva jednaka dela i da se da ribama u dva obroka dnevno, u razmaku od najmanje 5 sati. Obrok se bazira na početnoj ukupnoj težini ribe u pojedinačnom akvarijumu. Ako se riba ponovno meri 14. dana, obrok se preračunava. Hranu ribama uskratiti 24 sata pre merenja.

Nepojedena hrana i fekalni sadržaj se svakodnevno uklanjaju iz akvarijuma pažljivim čišćenjem dna svakog akvarijuma i to pomoću usisavanja.

*1.8.2.4. Svetlost i temperatura*

Svetlosni režim i temperatura vode odgovaraju vrsti ribe koja se koristi u ispitivanju (videti Deo drugi ove metode).

**1.8.3. Koncentracije ispitivane supstance**

Obično je potrebno pet različitih koncentracija ispitivane supstance bez obzira na ispitivanu postavku (videti odeljak 1.7.2. ove metode). Prethodno poznavanje toksičnosti ispitivane supstance (npr. iz ispitivanja akutne toksičnosti, odnosno iz preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega koncentracija) može da pomogne u izboru odgovarajućih uslova ispitivanja. Ako se ispitivanje obavlja u manje od pet koncentracija, navodi se objašnjenje. Najviša koncentracija test supstance ne sme da bude veća od granice rastvorljivosti supstance u vodi.

Kad se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti kao pomoć u pripremi osnovnog rastvora, konačna koncentracija tog sredstva nije veća od 0,1 ml/l i ako je moguće ista je u svim komorama za ispitivanje (videti odeljak 1.6.3. ove metode). Izbegavati upotrebu takvih sredstava kad god je moguće.

**1.8.4. Kontrole**

Broj kontrola sa vodom za razblaživanje zavisi od ispitivane postavke (videti odeljak 1.7. do 1.7.2. ove metode). Ako se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, postavlja se onoliko kontrola sa sredstvom za povećanje rastvorljivosti koliko ima kontrola sa vodom za razblaživanje.

**1.8.5. Učestalost analitičkih određivanja i merenja**

Tokom ispitivanja, koncentracije ispitivane supstance određuju se u regularnim intervalima.

U protočnom sistemu, protok razblaživača i toksični osnovni rastvori kontrolišu se u određenim intervalima, ako je moguće svakog dana. Ne variraju više od 10% u toku čitavog ispitivanja. Gde se očekivane koncentracije ispitivane supstance nalaze unutar ± 20% nominalnih vrednosti (tj. unutar opsega 80% do 120%, videti odeljke 1.6.2. i 1.6.3. ove metode), preporučuje se da se analiziraju najmanje najviša i najniža koncentracija na početku ispitivanja i nakon toga u nedeljnim intervalima. U slučajevima kada se ne očekuje da će koncentracija ostati unutar ± 20% nominalne (na osnovu podataka o stabilnosti test supstance), analizirati sve ispitivane koncentracije, ali prema istom rasporedu.

U polustatičnom sistemu (sa potpunim periodičnim obnavljanjem medijuma) u kojima se očekuje da će koncentracija ispitivane supstance ostati unutar ± 20% nominalne vrednosti, preporučuje se da se analiziraju najmanje najviša i najniža koncentracija neposredno nakon pripreme i neposredno pre obnavljanja na početku ispitivanja, a nakon toga jednom nedeljno. U slučajevima kada se ne očekuje da će koncentracija ispitivane supstance biti unutar ± 20% nominalne, sve koncentracije analizirati po istom postupku i rasporedu kakvi se koriste za stabilnije materije.

Preporučuje se da se rezultati baziraju na izmerenim koncentracijama. Ako je dokazano da se koncentracija ispitivane supstance u rastvoru održavala unutar ± 20% nominalne ili izmerene početne koncentracije u toku čitavog trajanja ispitivanja, rezultati se mogu bazirati na nominalnim ili izmerenim vrednostima.

Uzorci se po potrebi filtriraju (npr. korišćenjem veličine pora od 0,45 mm) ili centrifugiraju. Preporučuje se centrifugiranje. Ako se ispitivani materijal ne adsorbuje na filtere, filtracija može da bude prihvatljiv postupak.

Rastvoreni kiseonik, pH i temperatura mere se u svim komorama u toku ispitivanja. Ukupna tvrdoća, alkalitet i salinitet (ukoliko je relevantan) mere se u kontrolama i jednoj komori za ispitivanje sa najvišom koncentracijom. Rastvoreni kiseonik i salinitet (ukoliko je relevantan) mere se najmanje tri puta (na početku, sredini i kraju ispitivanja). Kod ispitivanja u polustatičkim uslovima, preporučuje se češće merenje rastvorenog kiseonika, ako je moguće pre i nakon svakog obnavljanja vode ili najmanje jednom nedeljno. Vrednost pH se meri na početku i kraju svakog obnavljanja vode u ispitivanoj postavci sa statičkim obnavljanjem i najmanje jednom nedeljno u protočnim uslovima. Tvrdoća i alkalitet se mere jednom u toku svakog ispitivanja. Temperatura se, ako je moguće, neprekidno prati u najmanje jednoj komori.

**1.8.6. Opažanja**

Prati se težina riba. Na kraju ispitivanja, sva preživela riba se izmeri i odredi se sveža masa (nakon brisanja suvišne vode) izraženo za celu grupu riba po komori ili za jedinku. Merenje riba po grupama iz pojedinačnih komora ima prednost nad merenjem pojedinačnih jedinki, jer ovaj drugi način zahteva da riba bude pojedinačno označena. U slučaju merenja težine pojedine ribe da bi se odredila specifična stopa rasta ribe, odabrana tehnika označavanja ne sme da izazove stres kod ispitivanih jedinki (pogodna alternativa hladnom žigosanju je korišćenje tankog pecaroškog kanapa u boji).

Riba se u toku trajanja ispitivanja svakodnevno pregleda, a sve spoljašnje abnormalnosti (kao što su krvarenje, promena boje) i abnormalno ponašanje se beleže. Beleži se i smrtnost, a mrtvu ribu što pre ukloniti iz komora. Mrtva riba se ne zamenjuje živom, jer su nasad i gustina nasada dovoljne da promena u broju jedinki u komori neće imati nikakve efekte na rast. Količinu hrane prilagoditi.

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Preporučljivo je uključiti statističara u proces izbora ispitivane postavke i analizu podataka, s obzirom da su ovom metodom ispitivanja dopuštene značajne varijacije u izvođenju, npr. u broju komora, ispitivanih koncentracija, riba, itd. S obzirom na opcije koje stoje na raspolaganju u smislu ispitivane postavke, ovde se ne daju posebne smernice u pogledu statističkih postupaka.

Brzine rasta se ne izračunavaju za komore u kojima je smrtnost veća od 10%. Stopa smrtnosti navodi se za sve ispitivane koncentracije.

Bilo koji postupak da se koristi za analizu podataka, uvek se određuje posebna brzina rasta *r* između vremena t1 i vremena t2. Može se definisati na nekoliko načina, u zavisnosti od toga da li je riba bila pojedinačno označena ili se traži prosek po komori.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| r1 = | loge w2 - loge w1 | x 100 |
| t2 - t1 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| r2 = | loge w2 - loge w1 | x 100 |
| t2 - t1 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| r3 = | loge w2 - loge w1 | x 100 |
| t2 - t1 |

pri čemu:

r1 jeste specifična brzina rasta pojedine ribe;

r2 jeste prosečna brzina rasta specifična za komoru;

r3 jeste "pseudo" specifična brzina rasta;

w1 i w2 jesu težine određene ribe u vremenu t1 odnosno vremenu t2;

logew1 jeste logaritam težine pojedine ribe na početku ispitivanja;

logew2 jeste logaritam težine pojedine ribe na kraju ispitivanja;

logew1 jeste prosek logaritskih vrednosti w1 za ribu u komori na početku ispitivanja;

logew2 jeste prosek logaritamskih vrednosti w2 za ribu u komori na kraju ispitivanja;

t1 i t2 jesu vreme (dani) na početku i kraju ispitivanog perioda.

r1, r2 i r3 mogu se izračunati za period od 0 do 28 dana i, ukoliko je primereno (tj. kad se radilo merenje 14. dana) za periode od 0 do 14 i od 14 do 28 dana.

**2.1.1. Regresiona analiza rezultata (modelovanje odgovora   
na koncentraciju)**

Ovom metodom analize utvrđuje se pogodan matematički odnos između specifične brzine rasta i koncentracije, što omogućava procenu ECx, tj. svake tražene EC vrednosti. Pomoću ovog postupka, nije potrebno izračunavati r za svaku pojedinu ribu (r1), već se analiza može bazirati na proseku komora za ispitivanje (r2). Prednost se daje drugom postupku, koji više odgovara i u slučaju upotrebe najmanjih vrsta.

Prosek specifične brzine rasta za komoru (r2) grafički se prikazuje u odnosu na koncentraciju, da bi se utvrdila dozna zavisnost.

Da bi se izrazio odnos između r2 i koncentracije, izabrati odgovarajući model, a izbor određenog modela argumentovati na odgovarajući način.

Ako se broj preživelih jedinki riba razlikuje od jedne do druge komore, model adaptirati, tako da se pondiranjem prevaziđe problem nejednake veličine grupa.

Postupak adaptacije na model omogućava procenu, npr. EC20 i njenog rasipanja (standardne greške ili intervala poverenja). Grafik adaptacije na model prikazati u odnosu na podatke, tako da se vidi da je adaptacija na model bila primerena**8, 18, 19, 20**.

**2.1.2. Analiza rezultata za procenu LOEC**

Ako su u ispitivanju korišćeni duplikati komora za svaku ispitivanu koncentraciju, procena LOEC se može bazirati na ANOVA prosečne specifične stope rasta riba po komori (videti odeljak 2.1. ove metode). Nakon ove analize može slediti odgovarajući postupak**12,13,14,21** poređenja prosečnog r za svaku koncentraciju sa prosečnim r za kontrole, da se identifikuje najniža koncentracija pri kojoj postoji značajna razlika na nivou verovatnoće od 0,05. Ako nisu zadovoljene potrebne pretpostavke za parametarsku statistiku - nenormalna distribucija ili heterogena varijansa, pre ANOVA podaci se mogu transobrazovati da bi se homogenizovale varijanse ili se može uraditi pondirana ANOVA.

Ako u ispitivanju nisu korišćeni duplikati komora za svaku koncentraciju, ANOVA na bazi podataka za celu komoru neće biti osetljiva ili je neće biti moguće uraditi. Kompromis je da se uradi ANOVA na "pseudo" specifičnim stopama rasta r3 za pojedinačne jedinke riba.

Prosečni r3 za svaku koncentraciju može se zatim porediti sa prosečnim r3 za svaku kontrolu. LOEC se može identifikovati kao i ranije. Ovaj postupak ne trpi, niti sprečava, varijabilnost između komora, osim varijabilnosti koja postoji zbog varijabilnosti između pojedinih jedinki riba. Iskustvo je pokazalo**8** da je varijabilnost između komora vrlo mala u poređenju sa varijabilnošću između jedinki. Ako se pojedinačne jedinke riba ne uključe u analizu, opisati postupak identifikacije ekstremnih vrednosti i opravdati njegovu upotrebu.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Rezultati se tumače sa oprezom kad se izmerene toksične koncentracije u rastvorima nalaze blizu granice detekcije primenjenog analitičkog postupka, ili kad se u polustatičnom sistemu za ispitivanje smanji koncentracija ispitivane supstance između sveže pripremljenog rastvora i pre obnavljanja.

*2.3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1. ispitivanoj supstanci:

- priroda supstance i relevantna fizička i hemijska svojstva;

- podaci o hemijskoj identifikaciji, uključujući čistoću i analitički postupak za kvantifikaciju ispitivane supstance ukoliko je primenljivo.

2. ispitivanoj vrsti:

- latinski naziv, ako je moguće: soj, veličina, dobavljač, prethodna obrada (ako je rađena) itd.

3. uslovima ispitivanja:

- primenjeni postupak (npr. statički, polustatički, protočni i dr);

- ispitivana postavka (npr. broj akvarijuma, koncentracije i duplikati, broj riba po komori);

- postupak pripreme osnovnog rastvora i učestalost obnavljanja (navesti ako se koristilo sredstvo za povećanje rastvorljivosti i njegova koncentracija);

- nominalne koncentracije test supstance, srednja vrednost izmerenih vrednosti i njihove standardne devijacije u komorama i metoda kojom su dobijene, kao i dokaz da se merenja odnose na koncentracije ispitivane supstance u pravom rastvoru;

- svojstva vode za razblaživanje: pH, tvrdoća, alkalitet, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, nivo rezidualnog hlora (ukoliko je meren), ukupni organski ugljenik, suspendovane čestice, salinitet medijuma (ukoliko je meren) i sva druga obavljena merenja;

- kvalitet vode u komorama (pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika);

- detaljne podatke o ishrani (npr. vrsta, poreklo i količina hrane, ako i dinamika ishrane).

4. rezultatima:

- dokaz da su kontrole zadovoljile kriterijume prihvatljivosti što se tiče preživljenja i podaci o smrtnosti pri svakoj pojedinoj koncentraciji test supstance;

- korišćene statističke analitičke tehnike, statistika utemeljena na duplikatima merenja ili na jedinki, obrada podataka i opravdanje za primenjene tehnike;

- podaci navedeni u tabeli o težini pojedinačnih riba i srednjoj težini riba nultog, 14. (ukoliko se težina merila 14. dana) i 28. dana prosečne vrednosti po akvarijumu ili pseudospecifične brzine rasta (ukoliko je primereno) za period od 0. do 28. dana i ako je moguće od 0. do 14. kao i od 14. do 28. dana;

- rezultati statističke analize (tj. regresione analize ili ANOVA) ako je moguće dati tabelarno ili u grafičkom obliku i LOEC (p = 0,05) i NOEC ili ECx sa, kad je moguće, standardnim greškama (ukoliko je primereno);

- pojava svih neobičnih reakcija riba i svakog vidljivog efekta koji uzrokuje ispitivana supstanca.

**3. LITERATURA**

1. Solbe J.F. de LG (1987) Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Testof a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No PRD1388-M/2.

2. Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J., (1990) EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects ofChemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities.WRc Report No EEC 2600-M.

3. Crossland N.O. (1985) A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14,p. 1855-1870.

4. Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B., (1991) Effectof 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparativelaboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, p. 157-164.

5. Yamamoto, Tokio., (1975) Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology andstrains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6. Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D., (1995) Acute andlong-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Arch. Environ. Conta.Toxicol. 28, p. 287-297.

7. Benoit, D.A., HolCOmbe, G.W. and Spehar, R.L., (1991) Guidelines for COnducting early life toxicity testswith Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U.S. EnvironmentalProtection Agency, Duluth, Minesota.

8. Stephan C.E. and Rogers J.W., (1985) Advantages of using regression analysis to calculate results ofchronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891,R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328-338.

9. Environment Canada, (1992) Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish(rainbow trout, Coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, p. 81.

10. Cox D.R., (1958) Planning of experiments. Wiley Edt.

11. Pack S., (1991) Statistical issues Concerning the design of tests for determining the effects of chemicals onthe growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic ToxiCOlogy,WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

12. Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with aCOntrol, J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

13. Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

14. Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels areCompared with a zero dose Control. Biometrics 27, p. 103-117.

15. Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T., (1994) A technique using sequential feedings of differentColoured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feedinglevel. Aquaculture 120, p. 123-133.

16. Quinton, J. C. and Blake, R.W., (1990) The effect of feed cycling and ration level on the Compensatorygrowth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, p. 33-41.

17. Post, G., (1987) Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H.Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. p. 288.

18. Bruce, R.D. and Versteeg D.J., (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data.Environ. Toxicol. Chem. 11, p. 1485-1494.

19. DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O.,(1989) Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra andinterlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). ElectricPower Research Institute, Palo alto, CA.

20. Norbert-King T.J., (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. USEnvironmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. p. 12.

21. Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28,p. 510-531.

**Deo drugi**

**VRSTE RIBA PREPORUČENE ZA ISPITIVANJE I POGODNI USLOVI ISPITIVANJA**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vrsta | Preporučeni opseg temperature (°C) | Foto-period (h) | Preporučeni opseg za početnu težinu ribe (g) | Tražena preciznost merenja | Nasad Stopa opterećenja (g/l) | Gustina nasada (po litri) | Hrana - dužina ispitivanja (u danima) |
| Preporučene vrste: |  | | | | | | |
| Oncorhynchus mykiss (kalifornijska pastrmka) | 12,5-16,0 | 12-16 | 1-5 | do najbližih 100 mg | 1,2-2,0 | 4 | suva ≥ 28 hrana za mlađ salmonida |
| Ostale dobro opisane vrste: |  | | | | | | |
| *Danio rerio* (zebrica) | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | do najbližih 1 mg | 0,2-1,0 | 5-10 | živa hrana ≥ 28 (*Brachionus Artemia*) |
| *Oryzias latipes* | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | do najbližih 1 mg | 0,2-1,0 | 5-20 | živa hrana ≥ 28 (*Brachionus Artemia*) |

**Deo treći**

**HEMIJSKA SVOJSTVA VODE ZA RAZBLAŽIVANJE PRIHVATLJIVOG KVALITETA**

|  |  |
| --- | --- |
| SUPSTANCA | KONCENTRACIJA |
| Čestice | < 20 mg/l |
| Ukupni organski ugljenik | < 2 mg/l |
| Nejonizovani amonijak | < 1 µg/l |
| Rezidualni hlor | < 10 µg/l |
| Ukupni organofosfatni pesticidi | < 50 ng/l |
| Ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili | < 50 ng/l |
| Ukupni organski hlor | < 25 ng/l |

**Deo četvrti**

**LOGARITAMSKI NIZOVI KONCENTRACIJA KOJE SU POGODNE   
ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI9**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kolona (broj koncentracija između 100 i 10 ili između 10 i 1)**XII** | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
|  | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
|  | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
|  |  | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
|  |  | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
|  |  |  | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
|  |  |  | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
|  |  |  |  | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
|  |  |  |  | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
|  |  |  |  |  | 1,4 | 2,4 |
|  |  |  |  |  | 1,0 | 1,8 |
|  |  |  |  |  |  | 1,3 |
|  |  |  |  |  |  | 1,0 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XII** Niz od pet (ili više) uzastopnih koncentracija može se izabrati iz jedne od kolona u tabeli. Srednja tačka između dve koncentracija u n-toj koloni pronalaze se u koloni 2n + 1. Navedene vrednosti su koncentracije izražene u zapreminskim ili masenim procentima (mg/l ili µg/l). Vrednosti se mogu množiti ili deliti za faktor 10, po potrebi. Kolona 1 može se koristiti ako postoji značajna nesigurnost u vezi sa nivoom toksičnosti.

**C.15. RIBE: METODA ISPITIVANJA KRATKOROČNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONALNOM I LARVALNOM STADIJUMU**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 212 (1998).

*1.1. UVOD*

Metoda ispitivanja kratkoročne toksičnosti na embrione i larve riba je kratkoročni test u okviru kog se ispitivanoj supstanci izlažu različiti razvojni stadijumi ribe, od tek oplođenog jajeta pa sve do stadijuma na isteku faze hranjenja putem žumančane kese. U metodi kojom se ispituje toksičnost na embrionalni i larveni stadijum hrana se ne dodaje pa se ispitivanje okončava u fazi dok se larve još hrane putem žumančane kese.

Namena metode je određivanje letalnih i u izvesnoj meri, subletalnih efekata hemikalija na specifične razvojne stadijume i ispitivane vrste. Metoda ispitivanja pruža korisne podatke koji mogu:

1. predstavljati sponu između ispitivanja letalnog i subletalnog dejstva,

2. biti korišćena kao skrining test u okviru ispitivanja toksičnosti u celoj ranoj fazi života ili u okviru ispitivanja hronične toksičnosti i

3. biti korišćena za ispitivanje vrsta čije tehnike uzgoja nisu dovoljno uznapredovale da bi omogućile studije razdoblja promene iz endogenog u egzogeni način ishrane.

Preciznu procenu hronične toksičnosti hemikalije na ispitivanu vrstu mogu dati isključivo ispitivanja koja obuhvataju sve faze životnog ciklusa ribe. Svako skraćivanje izlaganja, koje nije obuhvatilo sve faze životnog ciklusa, može smanjiti osetljivost metode ispitivanja i potceniti hroničnu toksičnost hemikalije. Očekuje se da će ispitivanje na embrionalnom i larvalnom stadijumu biti manje osetljivo od ispitivanja toksičnosti u celoj ranoj fazi života, posebno ako se ispituje toksičnost izrazito lipofilnih hemikalija (log Pow> 4) i hemikalija specifičnog toksičnog dejstva. Kod hemikalija nespecifičnog, narkotičkog delovanja, očekuje se da razlike u osetljivosti budu manje**1**.

Pre objavljivanja ovog ispitivanja, najviše iskustava u ispitivanju toksičnosti na embrionalni i larvalni stadijum sakupljeno je na slatkovodnoj ribi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) - tzv. zebrica. Smernice za ispitivanja ove vrste ribe date su u Delu drugom ove metode. Mogu se koristiti i druge dobro proučene vrste (Tabela 1).

*1.2. DEFINICIJE*

Najniža efektivna koncentracija (Lowest Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: LOEC) jeste najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj je uočeno da supstanca, u poređenju sa kontrolnom grupom, izaziva značajno dejstvo (kod *p* < 0,05). Sve koncentracije više od LOEC u toku ispitivanja imaju štetno dejstvo jednako onom ili veće od onog uočenog pri LOEC.

Koncentracija koja ne dovodi do uočljivog efekta (No Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: NOEC) jeste koncentracija ispitivane supstance neposredno ispod LOEC.

*1.3. PRINCIP METODE*

Embrioni i larve riba izlažu se seriji koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi. U okviru ispitivane postavke, moguć je izbor semistatičkih ili protočnih uslova. Izbor zavisi od prirode ispitivane supstance. Ispitivanje započinje postavljanjem oplođenih jaja u komore za ispitivanje, a završava se neposredno pre nego žumančana kesa bilo koje larve, u bilo kojoj od ispitivanih komora, bude u potpunosti apsorbovana, odnosno pre nego što se u kontrolnoj grupi uoči smrtnost usled izgladnjivanja. Procenjuju se letalni i subletalni efekti, koji se zatim porede sa vrednostima u kontroli, da bi se odredila najniža efektivna koncentracija a time i koncentracija koja ne dovodi do uočljivog efekta. Rezultati se mogu analizirati i pomoću regresionog modela, da bi se procenila koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do određenog procentualnog efekta (LC/ECx, pri čemu je x procenat efekta).

*1.4. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Na raspolaganju je potrebno imati rezultate ispitivanja akutne toksičnosti (videti Metodu C.1. koja je data u ovom prilogu), ako je moguće na istoj vrsti koja je izabrana za ispitivanje. Rezultati mogu biti od pomoći pri izboru prikladnog opsega koncentracija ispitivane supstance za metodu ispitivanja na ranim stadijumima razvoja. Potrebno je poznavati rastvorljivost ispitivane supstance u vodi (uključujući i rastvorljivost u vodi koja se koristi za ispitivanje) i napon para ispitivane supstance. Potrebno je i pouzdana analitička metoda kojom se može odrediti količina ispitivane supstance u rastvorima o čijoj tačnosti i granici detekcije postoje dostupni podaci.

U podatke o ispitivanoj supstanci koji su od koristi pri uspostavljanju uslova ispitivanja u kojima se obavlja ispitivanje, spadaju strukturna formula ispitivane supstance, podaci o hemijskoj čistoći, fotostabilnosti, stabilnosti u ispitivanim uslovima, pKa, Pow i rezultati ispitivanja biorazgradljivosti (videti Metodu C.4. koja je data u ovom prilogu).

*1.5. PRIHVATLJIVOST ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, primenjuju se sledeći uslovi:

- ukupno preživljavanje oplođenih jaja u kontrolnim grupama i gde je relevantno, u posudama za ispitivanje punjenim samo rastvaračem, veće je ili jednako granicama definisanim u Delu trećem i četvrtom ove metode;

- u toku celog ispitivanja, koncentracija rastvorenog kiseonika iznosi između 60% i 100% vrednosti zasićenja vazduha (ASV);

- u toku celog ispitivanja, temperatura vode u pojedinim komorama ili uzastopnim danima ni u kom satu međusobno se ne razlikuje za više od ± 1,5° C i kreće se u temperaturnom opsegu specificiranom za tu ispitivanu vrstu (videti Deo treći i četvrti ove metode).

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Komore za ispitivanje**

Može se koristiti bilo kakva staklena posuda ili posuda od hemijski inertnog materijala. Dimenzije posuda su dovoljno velike da ispitivanje bude izvedeno u skladu sa preporučenim vrednostima nasada (videti odeljak 1.7.1.2. ove metode). Posude za ispitivanje raspoređuju se po principu slučajnog rasporeda. Ako u laboratoriji postoje sistemski efekti koji se mogu kontrolisati blok sistemom, slučajni raspored u blokovima (gde je svaki tretman smešten u po jedan blok) ima prednost nad potpuno nasumičnim rasporedom. Ako se radi u blokovima, sistem se uzima u obzir kod analize podataka. Ispitivane komore zaštititi od neželjenog uznemiravanja.

**1.6.2. Izbor vrste ribe**

Preporučene vrste riba navedene su u Tabeli 1A. Moguće je korišćenje drugih vrsta (primeri su navedeni u Tabeli 1B), ali se u tom slučaju procedura modifikuje, da bi se obezbedili zadovoljavajući ispitivani uslovi. Ako se koriste druge vrste dati objašnjenje za izbor vrste i opis ispitivane metode.

**1.6.3. Održavanje laboratorijske populacije riba**

Detalji o održavanju laboratorijske populacije riba u zadovoljavajućim uslovima mogu se naći u Uputstvu za ispitivanje OECD TG 210**XIII** i literaturi**2, 3, 4, 5, 6**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XIII** OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early -life Stage Toxicity Test"

**1.6.4. Postupanje sa embrionima i larvama**

Unutar glavne posude za ispitivanje, embrioni i larve mogu biti izloženi ispitivanoj supstanci u manjim posudama mrežastih zidova koji omogućavaju nesmetan protok ispitivanog rastvora kroz posudu. Ujednačen protok kroz ove male posude može se postići tako što se one okače o mehaničku ruku, nameštenu tako da posude pomiče gore-dole, držeći organizme neprekidno uronjene u medijum. Može se upotrebiti i sifonski sistem. Oplođena jaja salmonidnih riba mogu biti poduprta na šipkama ili mrežama čija su okca dovoljno velika da larve, nakon što se izlegu, mogu da propadnu kroz njih. U semistatičkim uslovima, u kojima je obezbeđeno svakodnevno obnavljanje rastvora, za uklanjanje embriona i larvi prikladno je upotrebiti Pasterove pipete (videti odeljak 1.6.6. ove metode).

Kada se za zadržavanje jaja unutar glavne posude koriste rešetke ili mreže, one se uklanjaju čim se larve izlegu, sa izuzetkom mreža koje su i dalje potrebne za sprečavanje bežanja larvi. Ako postoji potreba za premeštanjem larvi, one ne bi smele biti izložene vazduhu, niti se za puštanje ribe iz posudica za jaja smeju koristiti mrežice (ova mera opreza može biti suvišna ako se radi o nekoj manje osetljivoj vrsti ribe, npr. šaranu). Pogodan momenat za premeštanje larvi varira od vrste do vrste, a sam premeštaj nije uvek nužan. Ako se ispitivanje odvija u semistatičkim uslovima, mogu se koristiti laboratorijske čaše ili plitke posude, po potrebi opremljene mrežicom podignutom iznad dna posude. Premeštanje embriona ili larvi nije neophodno ako je zapremina ovih posuda dovoljna da zadovolji postavljene zahteve u pogledu nasada (videti odeljak 1.7.1.2. ove metode).

**1.6.5. Voda**

Svaka voda čija hemijska svojstva odgovaraju svojstvima prihvatljive vode za razblaživanje, (navedeno u Delu petom ove metode) i u kojoj jedinke ispitivane vrste u kontrolnim grupama preživljavaju barem u meri kako je opisano u Delu trećem i četvrtom ove metode, prikladna je za ispitivanje. Kvalitet vode ostaje nepromenjen u toku celog ispitivanja. Vrednost pH održavati u opsegu od ± 0,5. Kako bi se osiguralo da voda koja se koristi za razblaživanje ne utiče prekomerno na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance) ili negativno ne utiče na ponašanje matičnog jata, uzorke vode povremeno analizirati. Ako se zna da se kvalitet vode korišćene za razblaživanje bitno ne menja, svaka tri meseca izmeriti koncentraciju teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i CO4), pesticida (npr. ukupne organofosforne i organohlorne pesticide), ukupnu koncentraciju organskog ugljenika i u vodi suspendovanih materija. Ako se pokaže da je kvalitet vode konstantan u toku perioda od najmanje godinu dana, analize ovih pokazatelja nije potrebno da budu tako česte, pa se razmaci između dve analize produžavaju (na svakih šest meseci).

**1.6.6. Rastvori ispitivane supstance**

Rastvori ispitivane supstance izabrane koncentracije pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora.

Osnovni rastvor se priprema tako što se ispitivana supstanca jednostavno mehanički promeša sa vodom za razblaživanje ili protrese u njoj (mešanjem i pomoću ultrazvuka). Odgovarajuća koncentracija osnovnog rastvora može se obezbediti upotrebom kolona zasićenja (kolona rastvorljivosti). Upotrebu rastvarača ili disperzionih sredstava (agensa koji olakšavaju rastvaranje) izbegavati kad god je moguće. Pripremanje osnovnog rastvora odgovarajuće koncentracije u nekim slučajevima iziskuje upotrebu ovih jedinjenja. U odgovarajuće rastvarače spadaju: aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. U odgovarajuća disperziona sredstva spadaju: Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Pri upotrebi biorazgradljivih agenasa (npr. acetona), odnosno lako isparljivih jedinjenja potrebno je preduzeti određene mere opreza, jer kod ispitivanja u protočnim uslovima mogu izazvati probleme u smislu bakterijske nadgradnje. Ako se koristi sredstvo koje olakšava rastvorljivost, ono ne sme imati nikakvih značajnih efekata na preživljavanje, niti vidljivih neželjenih efekata na rane razvojne oblike riba kontrolne grupe, izložene samo rastvaraču.

Ako se ispitivanje obavlja u polustatičnom sistemu, obnavljanje ispitivanog rastvora može da se radi na dva načina: ispitivani rastvor se priprema u čistim posudama, a preživela jaja i larve u maloj zapremini starog rastvora nežno premeštaju u nove posude, izbegavajući pritom pristup vazduha, ili se ispitivani organizmi zadrže u posudama, a promeni određeni deo (najmanje tri četvrtine) rastvora. Učestalost obnavljanja medijuma zavisi od stabilnosti ispitivane supstance, ali se preporučuje da bude svakodnevno. Ako se prema rezultatima skrining testa (videti odeljak 1.4. ove metode) pokaže da koncentracija ispitivane supstance u toku perioda između obnavljanja nije stabilna (tj. izlazi iz opsega od 80% do 120% nominalnih vrednosti, odnosno pada ispod 80% prvobitno izmerene koncentracije), nužno je razmotriti mogućnost ispitivanja u protočnim uslovima. U toku obnavljanja rastvora paziti da se izbegne stresogeno dejstvo na larve.

Za ispitivanja koja se izvode u protočnim uslovima neophodan je sistem koji će neprekidno raspršivati i razblaživati osnovni rastvor ispitivane supstance (npr. merna pumpa, proporcionalni razblaživač, sistem za zasićenje) kako bi ispitivana supstanca stizala u ispitivane komore u seriji koncentracija. Tokom trajanja ispitivanja, protok osnovnog rastvora i vode za razblaživanje povremeno proveriti, ako je moguće svakodnevno, a protok u toku celog trajanja ispitivanja ne sme da varira za više od 10%. Kao odgovarajući pokazao se 24-satni protok ekvivalentan ukupnoj zapremini minimum pet komora**2** za ispitivanje.

*1.7. PROCEDURA*

Korisni podaci o ispitivanju toksičnosti na embrionima i larvama su dostupni u literaturi**7,8,9**.

**1.7.1. Uslovi izlaganja**

*1.7.1.1. Trajanje*

Ispitivanje započeti u prvih 30 minuta nakon oplodnje jaja. Embrioni se u ispitivani rastvor uranjaju pre nego što nastupi cepanje blastodiska, odnosno što pre nakon toga, ali u svakom slučaju pre početka stadijuma gastrule. Ako se koriste jaja nabavljena od komercijalnog dobavljača, može se dogoditi da sa ispitivanjem nije moguće započeti odmah nakon oplodnje. Kako odlaganje početka ispitivanja može značajno da naruši osetljivost metode, ispitivanje započeti najdalje osam sati od oplodnje. Larve se u toku perioda izlaganja ne hrane, pa ispitivanje okončati neposredno pre nego što žumančana kesa bilo koje larve, u bilo kojoj od ispitivanja komora, bude u potpunosti apsorbovana, odnosno pre nego što larve u kontrolnim grupama uginu od izgladnelosti. Trajanje ispitivanja zavisi od vrste ribe. Neke preporučene dužine trajanja ispitivanja navedene su u Delu trećem i četvrtom ove metode.

*1.7.1.2. Nasad*

Na početku ispitivanja broj oplođenih jaja zadovoljava statističke zahteve. Jaja nasumice rasporediti između tretmana. Svakoj koncentraciji ispitivane supstance izložiti najmanje 30 oplođenih jaja, koliko je moguće jednako raspodeljenih u najmanje tri replike (kod nekih vrsta riba teško je dobiti jednake serije). Nasad (biomasa po zapremini rastvora) je dovoljno nizak da se koncentracija rastvorenog kiseonika može bez aeracije održavati na minimum 60% ASV. Kod ispitivanja u protočnim uslovima, preporučuje se da nasad u 24 sata ne prelazi 0,5 g/l, odnosno da ni u kom trenutku ne prelazi 5 g/l rastvora**2**.

*1.7.1.3. Osvetljenje i temperatura*

Fotoperiod i temperatura rastvora su odgovarajući za svaku ispitivanu vrstu (videti Deo treći i četvrti ove metode). Za praćenje temperature prikladna je upotreba dodatne posude za ispitivanje.

**1.7.2. Koncentracije ispitivane supstance**

Uobičajeno je da se ispitivanje obavlja u seriji od pet koncentracija ispitivane supstance u rastućem nizu, koji se međusobno razlikuju za konstantno isti faktor, ne veći od 3,2. Pri izboru opsega ispitivanih koncentracija uzeti u obzir krivu zavisnosti LC50 i vremena izlaganja, dobijenu ispitivanjem akutne toksičnosti. U nekim slučajevima, npr. kod ispitivanja namenjenih određivanju gornje granične koncentracije, ispitivanje se obavlja u manje od pet koncentracija ili u seriji užeg opsega. Ako se ispitivanje obavlja u manje od pet koncentracija ispitivane supstance, navodi se objašnjenje. Koncentracije supstance koje prelaze 96 h LC50, odnosno 100 mg/l (zavisno od toga koja je od navedenih vrednosti niža) ne ispituju se. Supstance ne ispitivati u koncentracijama koje prelaze granicu njihove rastvorljivosti u medijumu.

Ako se za pripremu ispitivanog rastvora koristi sredstvo koje olakšava rastvaranje (videti odeljak 1.6.6. ove metode), njegova krajnja koncentracija u svim posudama je jednaka i ne prelazi 0,1 ml/l.

**1.7.3. Kontrolne grupe**

Uz seriju koncentracija ispitivane supstance, postaviti i jednu kontrolnu grupu (u potrebnom broju ponavljanja) u kojoj se nalazi samo voda za razblaživanje i ukoliko je u konkretnom slučaju relevantno, jednu (u potrebnom broju ponavljanja) kontrolnu grupu u kojoj medijum sadrži i sredstvo za lakše rastvaranje ispitivane supstance.

**1.7.4. Učestalost analitičkih određivanja i merenja**

Koncentracije ispitivane supstance određuju se u pravilnim vremenskim razmacima, tokom ispitivanja.

Ako se ispitivanja izvode u polustatičkim uslovima, u kojima se očekuje da će se koncentracija ispitivane supstance zadržati unutar ± 20% nominalnih vrednosti, odnosno u opsegu od 80% do 120% (videti odeljke 1.4. i 1.6.6. ove metode), barem se tri puta u pravilnim vremenskim razmacima analiziraju uzorci najviše i najniže koncentracije, tako što se prve analize rade neposredno nakon pripreme rastvora, a zatim i odmah nakon njihovog obnavljanja. Znači da je potrebno analizirati uzorak istog rastvora - sveže pripremljen i prilikom obnavljanja.

U ispitivanjima kod kojih se na osnovu podataka o stabilnosti supstance ne očekuje da će se njena koncentracija zadržati unutar ± 20% nominalne vrednosti, neophodno je analizirati rastvore svih koncentracija neposredno nakon pripreme i prilikom njihovog obnavljanja, pridržavajući se opisanog režima kontrole (analiza se obavlja u najmanje 3 navrata u pravilnim vremenskim razmacima). Koncentraciju ispitivane supstance pre obnavljanja u svakom rastvoru neophodno je odrediti u jednoj od replika, u razmaku ne dužem od sedam dana. Preporučuje se da se rezultati ispitivanja baziraju na izmerenim koncentracijama. Ali, ako postoje dokazi da se ispitivana koncentracija na zadovoljavajući način održava unutar ± 20% nominalne ili izmerene prvobitne koncentracije, rezultati se mogu bazirati na nominalnim ili prvobitno izmerenim vrednostima.

Ako se ispitivanje izvodi u protočnim uslovima, prikladan je režim uzimanja uzorka za analizu sličan režimu opisanom za semistatičke uslove (ali u ovom slučaju merenje "starih" rastvora nije primenljivo). Ako ispitivanje traje duže od sedam dana, preporučljivo je da se poveća broj uzoraka uzetih u toku prve nedelje (obaviti tri serije merenja) da bi se osiguralo da ispitivane koncentracije i dalje budu stabilne.

Nekada je potrebno uzorke centrifugirati ili filtrirati (pomoću 0,45 μm filtera). Ali, ako ni u jednom od dva pomenuta načina pripreme uzoraka nije moguće razdvojiti biodostupnu frakciju ispitivane supstance od bionedostupne, uzorci se ne podvrgavaju ovim postupcima.

Tokom ispitivanja, u svim posudama meriti rastvoreni kiseonik, pH i temperaturu. U kontrolnim posudama i posudi u kojoj je koncentracija ispitivane supstance najviša, neophodno je izmeriti ukupnu tvrdoću rastvora i salinitet, ukoliko je merodavan, najmanje tri puta (na početku, sredinom i na kraju ispitivanja). Ako se ispitivanje izvodi u semistatičkim uslovima, preporučuje se da se rastvoreni kiseonik meri češće, ako je moguće pre i nakon svakog obnavljanja vode, odnosno minimum jednom nedeljno. Pri ispitivanju u uslovima statičkog obnavljanja, pH vrednost meriti na početku i na kraju svakog obnavljanja vode, a pri ispitivanju u protočnim uslovima najmanje jednom nedeljno. Tvrdoću rastvora izmeriti jednom u toku ispitivanja. Temperaturu meriti svakodnevno, a preporučljivo je da se u najmanje jednoj od posuda prati neprekidno.

**1.7.5. Zapažanja**

*1.7.5.1. Razvojni stadijum embriona*

Na početku izlaganja ispitivanoj supstanci, embrionalni stadijum (tj. stadijum gastrule) potvrditi što je preciznije moguće. To se postiže pomoću reprezentativnog uzorka, adekvatno sačuvanih i očišćenih jaja. Opis i ilustracije razvojnih stadijuma dati su u literaturi2**, 5, 10, 11**.

*1.7.5.2. Izvaljivanje iz jaja i preživljavanje*

Zapažanja koja se odnose na izvaljivanje iz jaja i preživljavanje, zapisuju se najmanje jednom dnevno. Na početku ispitivanja poželjno je da se zapažanja obave i češće (u toku prva tri sata na svakih 30 minuta), jer u nekim slučajevima (npr. kada se javljaju akutni toksični efekti), vremena preživljavanja mogu biti od veće važnosti nego broj uginulih primeraka. Uginule embrione i larve ukloniti odmah po opažanju, jer se mogu vrlo brzo raspasti. Pri odstranjivanju uginulih primeraka, posebnu pažnju posvetiti tome da se ne udare ili fizički oštete jaja/larve u neposrednoj blizini, koje su posebno nežne i osetljive. Kriterijumi za proglašavanje smrti variraju u zavisnosti od stadijuma životnog ciklusa:

- za jaja - primetan gubitak prozirnosti i promena boje uzrokovani zgrušavanjem, odnosno precipitacijom belančevina, što uslovljava beo, neproziran izgled, naročito u ranim razvojnim stadijumima;

- za embrione - odsustvo kretnji tela i/ili pulsa, odnosno promena boje i neproziran izgled vrsta čiji su embrioni u redovnim okolnostima prozirni;

- za larve - nepokretnost i/ili odsustvo pokreta disanja i/ili odsustvo pulsa i/ili belo neprozirno obojen centralni nervni sistem i/ili izostanak reakcije na mehanički nadražaj.

*1.7.5.3. Patološki izgled*

Broj larvi patološkog oblika tela, odnosno boje, kao i stadijum apsorpcije u kom se nalazi žumančana kesa, beležiti u adekvatnim vremenskim razmacima zavisno od dužine ispitivanja i prirode patološke promene koja se opisuje. Patološki oblici embriona i larvi javljaju se i prirodno, a njihova zastupljenost u kontrolnoj grupi (grupama) nekih vrsta može biti reda veličine nekoliko procenata. Životinje patoloških obeležja iz posude za ispitivanje ukloniti tek kad uginu.

*1.7.5.4. Patološko ponašanje*

Patološke promene, npr. hiperventilaciju, nekoordinisano plivanje i atipično mirovanje, zabeležiti u adekvatnim vremenskim razmacima u zavisnosti od dužine ispitivanja. Iako ih je teško kvantifikovati, ovi efekti kada se opaze mogu pomoći u tumačenju rezultata smrtnosti, tj. dati podatke o načinu toksičnog dejstva ispitivane supstance.

*1.7.5.5. Dužina*

Na kraju ispitivanja, preporučljivo je izmeriti dužinu svake jedinke. Moguće je meriti standardnu, poprečnu ili ukupnu dužinu. Ako repno peraje istrune ili erodira, izmeriti standardnu dužinu. U dobro sprovedenom ispitivanju, koeficijent varijacije dužine replika uglavnom iznosi ± 20%.

*1.7.5.6. Težina*

Na kraju ispitivanja izmeriti težinu svake jedinke. Prednost se daje suvoj masi (riba sušena 24 sata na temperaturi od 60° C) u odnosu na svežu (površina ribljeg tela osuši se upijanjem). U dobro obavljenom ispitivanju, koeficijent varijacije težine replika iznosi ± 20%.

Ova zapažanja će rezultirati nekim ili svim navedenim podacima koji se mogu analizirati statistički:

- kumulativna smrtnost;

- broj zdravih larvi u pojedinoj replici zabeležen na kraju ispitivanja;

- vreme proteklo do početka, odnosno do okončanja izvaljivanja (tj. vreme koje je u svakoj replici bilo potrebno da se izlegne 90% larvi);

- broj larvi koji se dnevno izvalio;

- dužina (i težina) preživelih životinja na kraju ispitivanja;

- broj larvi patološkog oblika ili izgleda;

- broj larvi patološkog ponašanja.

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Preporučuje se da u ispitivanu postavku i analizu bude uključen statističar, jer ova metoda omogućava znatne varijacije u ispitivanoj postavci, npr. u broju upotrebljenih ispitivanih posuda, broju ispitivanih koncentracija, početnom broju oplođenih jaja i mernim pokazateljima. S obzirom na broj opcija koje pri postavci ove metode ispitivanja stoje na raspolaganju, ovde nisu navedene specifične smernice za statističku obradu rezultata.

Ako je potrebno odrediti LOEC/NOEC, neophodno je analizirati varijacije unutar svakog od setova replika, i to upotrebom analize varijance (ANOVA) ili postupcima koji koriste tablice kontingencije. Pri višestrukom poređenju rezultata dobijenih pri izlaganju pojedinim koncentracijama ispitivane supstance i rezultata dobijenih u kontrolnim grupama, može biti korisna Dunetova metoda**12,13**. Na raspolaganju su i druge korisne metode**14,15**. Veličina efekta koja se detektuje pomoću ANOVA ili drugih postupaka statističke obrade (tj. statistička snaga), izračunava se i navodi. Za statističku analizu putem ANOVA nisu prikladna sva zapažanja navedena u odeljku 1.7.5.6. ove metode. Na primer, kumulativna smrtnost i broj zdravih larvi u pojedinoj replici, zabeleženi na kraju ispitivanja, analiziraju se probit metodama.

Ako se određuje LC/ECx, adekvatnu krivu (kao što je logistička) prilagoditi značajnim podacima koristeći statističke metode poput metoda najmanjih kvadrata ili metoda nelinearnih najmanjih kvadrata. Krivu (krive) parametarski prilagoditi na način da se LC/ECx od interesa i njena standardna greška mogu direktno utvrditi. Ovo će značajno olakšati izračunavanje intervala poverenja oko vrednosti LC/ECx. Ako ne postoje dobri razlozi za davanje prednosti drugačijim nivoima poverenja, interval poverenja koji je potrebno navesti je dvostrani 95%-ni. Postupak prilagođavanja krive osigurati na način na koji će se proceniti statistički značaj neprilagođenosti. Za prilagođavanje krivih koristiti grafičke metode. Regresiona analiza je pogodna za analizu svih zapažanja nabrojenih u odeljku 1.7.5.6. ove metode.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Kada se izmerene koncentracije ispitivane supstance nalaze u koncentracijama bliskim granici detekcije analitičke metode, rezultate tumačiti oprezno. Treba paziti i kod tumačenja rezultata dobijenih pri izlaganju ispitivanih modela koncentracijama koje prelaze rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

*2.3. IZVEŠTAJ*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda i relevantna fizička i hemijska svojstva;

- podaci od značaja za hemijsku identifikaciju supstance kao što su njena hemijska čistoća i gde je primereno, analitička metoda kojom se može kvantifikovati ispitivana supstanca.

2) ispitivanoj vrsti:

- latinski naziv, soj, broj roditeljskih jedinki riba (tj. koliko je ženki upotrebljeno da bi se u svakoj od replika obezbedio potreban broj jaja), izvor i metoda sakupljanja oplođenih jaja, kao i rukovanje njima.

3) uslovima ispitivanja:

- primenjena procedura ispitivanja (npr. polustatični ili protočni sistem, vreme proteklo od oplodnje do početka ispitivanja, nasad, itd);

- fotoperiod;

- ispitivana postavka (npr. broj ispitivanih posuda i replika, broj embriona u svakoj od replika);

- metoda pripreme osnovnih rastvora i učestalost njihovog obnavljanja (koncentracija rastvarača ako se koristi);

- nominalne koncentracije ispitivane supstance, izmerene vrednosti, njihove aritmetičke sredine i standardna devijacija, metoda kojom su dobijene, i ukoliko je ispitivana supstanca u vodi rastvorljiva u koncentracijama nižim od ispitivanih dokazi da se merenja odnose na koncentracije ispitivane supstance u rastvoru;

- karakteristike vode za razblaživanje (pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, nivoi rezidualnog hlora, ukoliko su izmereni, ukupni organski ugljenik, koncentracija suspendovanih materija, salinitet ispitivanog medijuma, ukoliko je izmeren) i rezultati bilo kojih drugih merenja;

- kvalitet vode u posudama za ispitivanje (pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika);

4) rezultatima:

- rezultati svih prethodno obavljenih studija o stabilnosti ispitivane supstance;

- dokazi da je stopa preživljavanja u kontrolnim grupama zadovoljila standard prihvatljivosti za ispitivanu vrstu (videti Deo treći i četvrti ove metode);

- podaci o smrtnosti/preživljavanju u embrionalnom i larvalnom stadijumu, i ukupna smrtnost/ukupno preživljavanje;

- broj dana do izvaljivanja i broj izvaljenih larvi;

- podaci o dužini (i težini);

- učestalost i opis patoloških morfoloških oblika, ako ih je bilo;

- učestalost i opis efekata ispitivane supstance na ponašanje ispitivanog modela, ukoliko je takvih bilo;

- statistička analiza i obrada podataka;

- za ispitivanja čiji su rezultati analizirani pomoću ANOVA, za svaki od utvrđenih odgovora ispitivanog modela na izlaganje ispitivanoj supstanci, najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se na nivou značaja od *p* = 0,05 javlja LOEC, odnosno ne javlja statistički značajan efekat NOEC, uključujući i opis primenjenih statističkih postupaka i naznaku veličine efekta koji se mogao detektovati;

- ako su rezultati ispitivanja analizirani regresionim tehnikama, LC/ECn i intervali poverenja kao i grafički prikaz prilagođenog modela korišćenog pri izračunavanju;

- objašnjenje bilo kakvog odstupanja od ove metode ispitivanja.

**3. LITERATURA**

1. Kristensen P., (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, p. 60. June 1990.

2. ASTM (1988) Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. p. 26

3. Brauhn J.L. and Schoettger R.A., (1975) Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4. Brungs W.A. and Jones B.R., (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5. Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 121-173.

6. Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, p. 328-330.

7. Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T., (1987) Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, p. 61-71.

8. Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G., (1985) Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 807-821.

9. Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, p. 129-145.

10. Kirchen R.V. and W. R. West (1969) Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11. Kirchen R.V. and W. R. West (1976) The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. p. 36.

12. Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

13. Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

14. Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G., (1980) Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

15. Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J., (1990) Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, p. 321-334.

16. Environment Canada., (1992) Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, p. 81.

17. Dave G. and Xiu R., (1991) Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, p. 126-134.

18. Meyer A., Bierman C.H. and Orti G., (1993) The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology - an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

19. Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P., (1995) Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, p. 19-28.

20. US EPA, (1991) Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21. US EPA, (1991) Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22. De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D., (1991) Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, p. 1189-1203.

23. Calow P., (1993) Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24. Balon E.K., (1985) Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, p. 280.

25. Blaxter J.H.S., (1988) Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, p. 1-58.

Tabela 1a: Preporučene vrste riba za metodu ispitivanja

|  |
| --- |
| SLATKOVODNE |
| *Oncorhynchus mykiss***9,16** (pastrmka) |
| *Danio rerio***7,17,18** (zebrica) |
| *Cyprinus caprio***8,19** (šaran) |
| *Oryzias latipes***20,21** |
| *Pimephales promelas***8,22** |

Tabela 1b: Ostale dobro proučene vrste koje se mogu koristiti

|  |  |
| --- | --- |
| SLATKOVODNE | MORSKE |
| *Carassius auratus* (srebrni karaš/ babuška) | *Menidia peninsulae***23,24,25** *Clupea harengus***5** (haringa) |
| *Lepomis macrochirus***8** (sunčanica) | *Gadus morhua***24,25** (bakalar) |
|  | *Cyprinodon variegatus***23, 24, 25** (bjelica) |

**Deo drugi**

**UPUTSTVO ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONIMA I LARVAMA *Brachydanio rerio* (zebrica)**

UVOD

Zebrica potiče sa indijske obale (Koromandel), gde naseljava brzake. Reč je o običnoj akvarijumskoj ribi iz porodice šarana, a podaci o postupcima držanja i uzgoja mogu se naći u standardnim priručnicima o tropskim ribama. Biologija ove ribe i njena upotreba u istraživanjima iz domena ribarstva, data je u literaturi1.

Primerci ove ribe retko su duži od 45 mm. Telo im je cilindričnog oblika, sa 7 do 9 tamnoplavih uzdužnih srebrnkastih pruga koje se protežu do repnog i analnog peraja. Dorzalna strana im je maslinastozelene boje. Mužjaci su vitkiji od ženki. Ženke su srebrnkastije, a abdomen im je rastegnut, naročito pre mresta.

Odrasle ribe podnose velike fluktuacije temperature, pH i tvrdoće vode. Međutim, da bi se dobila zdrava riba koja proizvodi kvalitetna jaja, potrebno je obezbediti optimalne uslove.

Tokom mresta, mužjak prati ženku i nasrće na nju, a jaja budu oplođena čim se izbace. Jaja, koja su prozirna i nelepljiva, padaju na dno, na kom ih roditelji mogu pojesti. Na mrest utiče svetlost. Ukoliko je jutarnje svetlo adekvatno, riba se mresti u ranim jutarnjim satima, u zoru.

Ženka u razmaku od po nedelju dana može proizvesti serije od nekoliko stotina jaja.

USLOVI KOJE TREBA OBEZBEDITI RODITELJSKOJ POPULACIJI, REPRODUKCIJA I RANI RAZVOJNI STADIJUMI

Izabere se odgovarajući broj zdravih jedinki i drže se u odgovarajućoj vodi (videti Deo peti ove metode) najmanje 2 nedelje pre mresta. Grupi riba dozvoliti da se razmnožava najmanje jednom pre nego što će se jaja koristiti u ispitivanju. Gustina populacije u toku ovog perioda ne prelazi 1 gram ribe po litri. Redovna izmena vode ili upotreba sistema za prečišćavanje vode obezbeđuje veću gustinu. Temperaturu u akvarijumima održavati na (25 ± 2)° C. Ribama davati raznovrsnu ishranu koja se može sastojati od pogodne komercijalne suve hrane, živih novoizleglih larvi artemija, hironomida, dafnija, enhitrada.

Postupci koji su u praksi obezbeđivali serije zdravih, oplođenih jaja, koja su korišćena za ispitivanja su:

U komoru za ispitivanje sa 50 L vode za razblaživanje smešta se osam ženki i 16 mužjaka, zaštiti od direktnog svetla i ostavi da uz što manje ometanja tamo borave najmanje 48 sati. Dan pre početka ispitivanja na dno komore se u poslepodnevnim satima postavlja posuda za mrest. Posuda se sastoji od okvira (od pleksiglasa ili nekog drugog prikladnog materijala), visine 5 cm do 7 cm, na čiji je vrh pričvršćena gruba mrežica promera okaca 2 mm do 5mm, a na dno se pričvrsti fina mrežica okaca od 10 μm do 30 μm. Na grubu mrežicu smeštenu na okvir pričvrsti se "drveće za mrest" napravljeno od raspletenog najlonskog užeta. Nakon što se riba 12 sati ostavi u mraku, upali se prigušeno svetlo koje stimuliše mrest. Dva do četiri sata nakon mresta, posuda za mrest se skloni i pokupe se jaja. Posuda za mrest sprečava ribe da pojedu jaja, a istovremeno omogućava da se ona lako sakupe. Pre mresta iz kojeg će se jaja koristiti u ispitivanjima, roditeljska grupa riba ima najmanje jedan mrest iz koga se jaja ne koriste u ispitivanju.

Najmanje dve nedelje pre planiranog mresta, 5 do 10 mužjaka i ženki drže se pojedinačno. Nakon 5 do 10 dana, trbusi ženki se rastežu, a njihove genitalne papile postaju vidljive. Mužjaci nemaju papile. Mrest se obavlja u za to namenjenim komorama, opremljenim lažno-mrežastim dnom (kako je opisano). Komora se napuni vodom za razblaživanje, tako da visina vodenog stuba iznad mrežice iznosi 5 cm do 10 cm. Dan pre planiranog mresta, u komoru se smešta jedna ženka i dva mužjaka. Temperatura vode se postupno povećava do vrednosti koja je za jedan stepen viša od temperature na koju su se ribe aklimatizovale. Komora se ostavi u mraku, bez uznemiravanja. Ujutro se upali prigušeno svetlo, što stimuliše mrest. Nakon 2 do 4 sata ribe se uklone, a jaja pokupe. Ako postoji potreba za serijama jaja većim od onih koje se mogu dobiti od jedne ženke, istovremeno se može postaviti veći broj takvih komora. Beleženjem uspešnosti reprodukcije pojedinih ženki pre početka ispitivanja (veličine i kvaliteta serije njihovih jaja), za priplod se mogu odabrati ženke čija je reprodukcija najuspešnija.

Jaja se u posude za ispitivanje prenose pomoću staklenih pipeta (unutrašnjeg promera ne manjeg od 4 mm), koje imaju gumenu pumpicu. Količina vode u kojoj se jaja prenose je što je moguće manja. Jaja su teža od vode pa lako iscure iz cevčice. Potrebno je preduzeti mere kojima se sprečava da jaja (i larve) dođu u dodir sa vazduhom. Uzorci serija se pregledaju mikroskopski, kako bi se uverilo da u početnim razvojnim stadijumima nema nepravilnosti. Dezinfekcija jaja nije dozvoljena.

Stopa smrtnosti jaja najviša je u prva 24 sata nakon oplodnje. Tokom ovog razdoblja često se uočava stopa smrtnosti od 5% do 40%. Jaja degenerišu zbog neuspešne oplodnje ili razvojnih mana. Čini se da kvalitet serije jaja zavisi od ženke, jer dok neke ženke dosledno proizvode kvalitetna jaja, kod drugih se to nikada neće dogoditi. Brzina razvoja i izvaljivanja larvi varira od serije do serije. Stopa preživljavanja uspešno oplođenih jaja i larvi je visoka, obično iznad 90%. Pri temperaturi od 25° C larve se izvaljuju iz jaja 3 do 5 dana nakon oplodnje, a žumančana kesa se apsorbuje otprilike 13 dana nakon oplodnje.

Dobro je istražen embrionalni razvoj**2**. Zbog prozirnosti jaja i larvi koje su se iz njih izvalile, prati se razvoj jedinki i uočavaju patološki razvojni oblici. Otprilike četiri sata nakon mresta, neoplođena jaja mogu se razlikovati od oplođenih**3**. Da bi se izvršilo ovaj pregled, jaja i larve se stavljaju u posude male zapremine i pregledaju pod mikroskopom.

Uslovi pod kojim se obavlja ispitivanje ranih razvojnih oblika nabrojani su u Delu trećem ove metode. Optimalna tvrdoća vode koja se koristi za razblaživanje je 250 mg CaCO3/l, a pH vrednost 7,8.

IZRAČUNAVANJE I STATISTIKA

Predlaže se dvostepeni pristup. Prvo se statistički analiziraju podaci o smrtnosti, patološkom razvoju i vremenu potrebnom da se larve izvale. Zatim se, kod riba izloženih koncentracijama ispitivane supstance pri kojima nisu uočeni nikakvi neželjeni efekti ni na jedan od ovih pokazatelja, statistički vrednuje dužina tela. Ovo je preporučljiv pristup jer toksična supstanca može selektivno letalno da deluje na manje jedinke, odloži vreme izvaljivanja i izazove makroskopski vidljive patološke oblike, dovodeći do odstupanja pri merenju dužine tela. Pri svakoj koncentraciji meri se u grubo isti broj jedinki, čime se obezbeđuje valjanost statističke obrade rezultata ispitivanja.

ODREĐIVANJE LC50 I EC50

Procenat preživelih embriona i larvi računa se i koriguje u odnosu na smrtnost zabeleženu u kontrolnim grupama, u skladu sa Abotovom jednačinom**4**:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| P = 100 - | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif |  | x 100 | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif |
| C - P' |
| C |
|  |

pri čemu:

P jeste korigovani procenat preživljavanja;

P' jeste procenat preživljavanja uočen pri test koncentraciji;

C jeste procenat preživljavanja u kontrolnim grupama.

Ako postoji mogućnost, LC50 se određuje prikladnom metodom na kraju ispitivanja.

Ako je u statističku analizu EC50 potrebno uključiti i morfološke abnormalnosti, smernice i uputstvo dati su u literaturi**5**.

ODREĐIVANJE LOEC I NOEC

Cilj ispitivanja toksičnosti na embrionima i larvama je poređenje delovanja koncentracija ispitivane supstance većih od nule sa kontrolnim grupama, odnosno cilj metode je odrediti LOEC. Zbog toga primeniti postupke višestrukog poređenja**6,7,8,9,10**.

LITERATURA

1. Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review.J. Fish Biol. 10, p. 121-173.

2. Hisaoka K.K. and Battle H.I., (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio(Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, p. 311.

3. Nagel R., (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerioHamilton-Buchanan).Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173-181.

4. Finney D.J., (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333.

5. Stephan C.E., (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment:Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing andMaterials, p. 69-81.

6. Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer.Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

7. Dunnett C.W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

8. Williams D.A., (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared witha Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103-117.

9. Williams D.A., (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531.

10. Sokal R.R. and Rohlf F.J., (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H.Freeman and Co., San Francisco.

**Deo treći**

**USLOVI ISPITIVANJA, TRAJANJE ISPITIVANJA I KRITERIJUMI OCENE PREŽIVLJAVANJA ZA VRSTE KOJE SU PREPORUČENE ZA OVU METODU ISPITIVANJA**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| VRSTE | TEMPERATURA (°C) | SALINITET (0/00) | FOTOPERIOD (SATI) | DUŽINA TRAJANJA STADIJUMA (DANI) | | TIPIČNA DUŽINA ISPITIVANJA | PREŽIVLJAVANJE U KONTROLNIM GRUPAMA, (MINIMUM %) | |
| &NBSP; | EMBRIONI | LARVE | USPEŠNO IZVALJIVANJE | POSLE IZVALJIVANJA |
| Slatkovodne | | | | | | | | |
| *Brachydanio rerio* (zebrica) | 25 ± 1 | - | 12-16 | 3-5 | 8-10 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana posle izvaljivanja (8 do 10 dana) | 80 | 90 |
| Oncorhynchus mykiss (pastrmka) | 10 ± 1**XIV** 12 ± 1**XV** | - | 0**XVI** | 30-35 | 25-30 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 20 dana posle izvaljivanja (50 do 55 dana) | 66 | 70 |
| *Cyprinus carpio* (šaran) | 21 - 25 | - | 12-16 | 5 | > 4 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana posle izvaljivanja (8 do 9 dana) | 80 | 75 |
| *Oryzias latipes* | 24 ± 1**XV** 23 ± 1**XVI** | - | 12-16 | 8-11 | 4-8 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana posle izvaljivanja (13 do 16 dana) | 80 | 80 |
| *Pimephales promelas* | 25 ± 2 | - | 16 | 4-5 | 5 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana posle izvaljivanja (8 do 9 dana) | 60 | 70 |

**Deo četvrti**

**USLOVI POD KOJIMA SE VRŠI ISPITIVANJE, DUŽINA ISPITIVANJA I KRITERIJUMI OCENE PREŽIVLJAVANJA ZA DRUGE DOBRO PROUČENE VRSTE**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| VRSTE | TEMPERATURA (°C) | SALINITET (0/00) | FOTOPERIOD (SATI) | DUŽINA TRAJANJA STADIJUMA (DANI) | | TIPIČNA DUŽINA ISPITIVANJA | PREŽIVLJAVANJE U KONTROLNIM GRUPAMA (MINIMUM %) | |
| EMBRIONI | LARVE | USPEŠNO IZVALJIVANJE | POSLE IZVALJIVANJA |
| slatkovodne | | | | | | | | |
| *Carassius auratu* | 24 ± 1 | - | - | 3-4 | > 4 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana posle izvaljivanja (7 dana) | - | 80 |
| *Leopomis macrochirus* | 21 ± 1 | - | 16 | 3 | > 4 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana posle izvaljivanja (7 dana) | - | 75 |
| morske | | | | | | | | |
| *Menidia peninsulae* | 22-25 | 15-22 | 12 | 1,5 | > 4 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana posle izvaljivanja (6 do 7 dana) | 80 | 60 |
| *Clupea harengus* | 10 ± 1 | 8-15 | 12 | 20-25 | 4-8 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 3 dana posle izvaljivanja (23 do 27 dana) | 60 | 80 |
| *Gadus morhua* | 5 ± 1 | 5-30 | 12 | 14-16 | 5 | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 3 dana posle izvaljivanja (18 dana) | 60 | 80 |
| *Cyprinodon variegatus* | 25 ± 1 | 15-30 | 12 | - | - | odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4/7 dana posle izvaljivanja (28 dana) | > 75 | 80 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XIV** Za embrione  
**XV** Za larve  
**XVI** Embrioni i larve do jedne nedelje nakon izvaljivanja drže se u mraku, osim kada se pregledaju. Od tada se primenjuje režim smanjenog osvetljenja.

**Deo peti**

**HEMIJSKA SVOJSTVA VODE PRIHVATLJIVE ZA RAZBLAŽIVANJE**

|  |  |
| --- | --- |
| SUPSTANCA | KONCENTRACIJE |
| Čestice | < 20 mg/l |
| Ukupni organski ugljenik | < 2 mg/l |
| Nejonizovani amonijak | < 1 mg/l |
| Rezidualni hlor | < 10 mg/l |
| Ukupni organofosforni pesticidi | < 50 ng/l |
| Ukupni organohlorni pesticidi i polihlorovani bifenili | < 50 ng/l |
| Ukupni organski hlor | < 25 ng/l |

**C.16. PČELE - ISPITIVANJE AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 213 (1998).

*1.1. UVOD*

Ova metoda ispitivanja toksičnosti jeste laboratorijska metoda dizajnirana za procenu akutne oralne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih hemikalija na odrasle pčele - radilice.

Postupak procene i vrednovanja toksičnih svojstava supstanci može zahtevati utvrđivanje akutne oralne toksičnosti kod pčela, npr. u slučajevima kada je verovatno da će pčele biti izložene datoj hemikaliji. Ispitivanje akutne oralne toksičnosti izvodi se da bi se utvrdila svojstvena toksičnost pesticida i drugih hemikalija na pčele. Rezultati ovog ispitivanja koriste se za utvrđivanje potrebe za daljim vrednovanjem. Metoda je posebno pogodna kod etapnih programa za procenu hazarda koji pesticidi predstavljaju za pčele, na osnovu hijerarhijskog redosleda, od laboratorijskih ispitivanja toksičnosti, do poluterenskih i terenskih ispitivanja**1**. Pesticidi se mogu ispitivati kao aktivne supstance (u daljem tekstu: a.s) ili kao formulisani proizvodi.

Osetljivost pčela i preciznost postupka ispitivanja potvrditi primenom standardnih toksičnih supstanci.

*1.2. DEFINICIJE*

Akutna oralna toksičnost jesu štetne posledice koje se javljaju najkasnije 96 sati nakon oralne primene jednokratne doze ispitivane supstance.

Doza jeste količina konzumirane ispitivane supstance i izražava se kao masa (mg) ispitivane supstance po jedinki (mg/pčela). Prava doza za svaku pčelu ne može se izračunati s obzirom na to da se pčele hrane kolektivno, ali se može izračunati prosečna doza (u potpunosti konzumirana ispitivana supstanca po broju jedinki - pčela u jednom kavezu).

Oralna LD50 (srednja letalna doza) jeste statistički izvedena jednokratna doza supstance koja može izazvati smrt 50% životinja kad se primenjuje oralno. Vrednost LD50 izražava se u (mg) ispitivane supstance po pčeli. Ako se ispituje dejstvo pesticida, ispitivana supstanca može biti aktivna supstanca ili formulisani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih supstanci.

Smrtnost jeste slučaj kada je jedinka potpuno nepomična i smatra se uginulom.

*1.3. PRINCIP METODE*

Odrasle pčele radilice (*Apis melifera*) izlažu se seriji doza ispitivane supstance, raspršene u rastvoru saharoze. Pčelama se nakon primene jednokratne doze daje ista hrana, ali bez ispitivane supstance. Smrtnost se beleži svakodnevno u toku najmanje 48 sati i poredi sa kontrolnim vrednostima. Ukoliko između 24 i 48 sata stopa smrtnosti raste, dok u kontrolnoj grupi i dalje ostaje na prihvatljivom nivou, odnosno < 10%, primereno je produžiti trajanje ispitivanja do najviše 96 sati. Rezultati ispitivanja se analiziraju da bi se izračunala vrednost LD50 nakon 24 i 48 sati, a u slučaju da je ispitivanje produženo i nakon 72 i 96 sati.

*1.4. KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTi ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, ispunjavaju se uslovi:

- prosečna smrtnost za ukupni broj kontrolnih grupa ne prelazi 10% na kraju ispitivanja;

- LD50 standarda toksičnosti se nalazi u određenom opsegu.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Sakupljanje pčela**

Koriste se mlade odrasle pčele radilice istog roda, odnosno pčele jednake starosti, stanja uhranjenosti itd. Pčele nabaviti iz adekvatno hranjenih, zdravih kolonija, bez zabeleženih bolesti, koliko je moguće, ustrojenih po hijerarhijskom principu matice, poznatog pedigrea i fiziološkog statusa. Mogu se sakupiti onog jutra kada se planira početak ispitivanja ili prethodno veče, pa ih do sutradan držati u eksperimentalnim uslovima. Prikladne su pčele sakupljene sa okvira na kojima nema jaja. Sakupljanje pčela u rano proleće ili kasnu jesen izbegavati, jer je njihova fiziologija u to vreme promenjena. Ako se ispitivanje izvodi u rano proleće ili kasnu jesen, pčele se mogu izleći u inkubatoru i othraniti nedelju dana "pčelinjim hlebom" (polenom sakupljenim iz saća) i rastvorom saharoze. Pčele tretirane hemijskim supstancama (antibiotici, proizvodi za uništavanje Varroa grinja) nije dozvoljeno koristiti za ispitivanje toksičnosti četiri nedelje nakon završetka poslednjeg tretmana.

**1.5.2. Uslovi smeštaja i ishrane**

Koriste se kavezi koji se lako čiste i dobro provetravaju. Mogu biti od bilo kog prikladnog materijala, npr. nerđajućeg čelika, žičane mreže, plastike, a mogu se koristiti i drveni kavezi za jednokratnu upotrebu itd. Preporučuju se grupe od 10 pčela po kavezu. Veličina kaveza je primerena broju pčela, kako bi im se pružio odgovarajući prostor.

Pčele držati u tamnoj laboratoriji na temperaturi od 25° C ± 2° C. Relativnu vlažnost, koja uobičajeno iznosi oko 50% do 70%, beležiti u toku trajanja celog ispitivanja. Postupci rukovanja, uključujući tretman i beleženje zapažanja, obavljaju se na dnevnom svetlu. Kao hrana koristi se vodeni rastvor saharoze, krajnje koncentracije od 500 g/l (50% odnosa težine i zapremine, w/v). Nakon što su date doze, hranu davati neograničeno (*ad libitum*). Sistem hranjenja omogućava praćenje unosa hrane za svaki kavez (videti odeljak 1.6.3.1. ove metode). Koristi se i staklena cevčica (dužine oko 50 mm, širine 10 mm, sa otvorenim krajem koji se sužava do promera od oko 2 mm).

**1.5.3. Priprema pčela**

Pčele sakupljene slučajnim rasporedom smeštaju se u kaveze koji se nalaze u laboratoriji, takođe po slučajnom rasporedu. Pčele se mogu izgladneti do 2 sata pre početka ispitivanja. Preporučuje se da se pčele ne hrane pre tretmana da bi na početku ispitivanja svim jedinkama crevni sadržaj bio isti. Pčele na umoru pre početka ispitivanja odbaciti i zameniti ih zdravim.

**1.5.4. Priprema doza**

Ako ispitivana supstanca spada u jedinjenja koja se mogu mešati sa vodom, može se direktno raspršiti u 50%-ni rastvor saharoze. Ako su u pitanju komercijalni proizvod i supstance slabo rastvorljive u vodi, mogu se upotrebiti nosači kao što su organski rastvarači, emulgatori ili disperziona sredstva niske toksičnosti za pčele (npr. aceton, dimetilformamid, dimetilsulfoksid). Koncentracija nosača zavisi od rastvorljivosti ispitivane supstance i u svim grupama, u svim koncentracijama je ista. Smatra se da je odgovarajuća koncentracija nosača 1% i ne prekoračuje se.

Pripremiti adekvatne kontrolne rastvore koji sadrže nosač (rastvarač ili disperziono sredstvo). Koriste se dve odvojene kontrolne grupe sa vodenim rastvorom i sa rastvorom saharoze u koju je dodat nosač i to u koncentraciji primenjenoj u ispitivanim rastvorima.

*1.6. POSTUPAK*

**1.6.1. Ispitivane i kontrolne grupe**

Broj doza i broj ponavljanja zadovoljava statističke zahteve u pogledu određivanja LD50 u intervalima poverenja od 95%. Obično se ispitivanje radi sa 5 doza u geometrijskoj seriji, sa faktorom ne većim od 2,2 tako da bude obuhvaćen opseg potreban za određivanje LD50. Faktor razblaženja i broj koncentracija za doziranje odrediti prema nagibu krive toksičnosti (doza prema smrtnosti), vodeći računa o zahtevima statističke metode odabrane za analizu rezultata. Preliminarna studija u cilju utvrđivanja opsega koncentracija omogućuje pravilan izbor ispitivanih koncentracija.

Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu izložiti svakoj ispitivanoj dozi. U svakom ispitivanju obezbediti najmanje tri kontrolne grupe sa po 10 pčela po kavezu. Uključiti i dodatne kontrolne grupe ako se koriste nosači (videti odeljak 1.5.4. ove metode).

**1.6.2. Standard toksičnosti**

U ispitivane serije uključiti i studija toksičnosti standarda. Da bi se obuhvatila očekivana vrednost LD50, potrebno je odabrati najmanje tri doze standardna. Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu izložiti svakoj dozi standarda. Kao standard toksičnosti obično se koristi dimetoat, čija se LD50 nakon 24 sata peroralne primene kreće u opsegu od 0,10 mg do 0,35 mg a.s./pčeli**2**. Prihvatljivi su i drugi standardi toksičnosti, pod uslovom da se raspolaže dovoljnom količinom podataka o očekivanoj doznoj zavisnosti (npr. paration).

**1.6.3. Izlaganje**

*1.6.3.1. Primena doza*

Svakoj od ispitivanih grupa pčela obezbediti 100 ml do 200 ml 50%-nog vodenog rastvora saharoze koji sadrži određenu koncentraciju ispitivane supstance. Ako se ispituju slabo rastvorljiva, netoksična ili jedinjenja koja se u komercijalnom proizvodu nalaze u niskim koncentracijama, primeniti veću zapreminu, jer je potrebno da njihov udeo u rastvoru saharoze bude veći. Pratiti količinu tretirane hrane koju je konzumirala svaka od ispitivanih grupa. Kada ispitivane jedinke pojedu tretiranu hranu (obično u toku 3 do 4 sata), hranilicu ukloniti iz kaveza i zameniti je drugom koja sadrži samo rastvor saharoze. Rastvor saharoze pčelama se stavlja na raspolaganje *ad libitum*. Kod nekih jedinjenja u višim koncentracijama, pčele tretiranu hranu mogu odbijati, što dovodi do toga da pojedu malo hrane ili je ne pojedu uopšte. Nakon najviše 6 sati hranilicu sa ostacima tretirane hrane zameniti netretiranom rastvorom saharoze. Proceniti koliko je tretirane hrane konzumirano (npr. merenjem odnosa zapremine ili mase ostataka tretirane hrane).

*1.6.3.2. Dužina ispitivanja*

Preporučuje se da, nakon što se ispitivani rastvor zameni netretiranim rastvorom saharoze, ispitivanje traje 48 sati. Ako se registruje rast smrtnosti nakon prva 24 sata za više od 10%, ispitivanje produžiti do najviše 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolnim grupama ne prelazi 10%.

*1.6.4. Zapažanja*

Smrtnost se beleži 4 sata nakon početka ispitivanja, zatim nakon 24 sata i 48 sati (nakon primene doze). Ukoliko se ukaže potreba da se ispitivanje produži, dalje procene vršiti u 24-satnim intervalima, najduže do ukupno 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolnim grupama ne prelazi 10%.

Potrebno je utvrditi količinu hrane koju je svaka grupa pčela konzumirala. Poređenje brzine konzumacije tretirane i netretirane hrane unutar određenog šestosatnog razdoblja može dati podatke o ukusu tretirane hrane.

Potrebno je zabeležiti sve pojave neuobičajenog ponašanja tokom ispitivanja.

**1.6.5. Granična studija**

U nekim slučajevima (npr. kada se očekuje da je ispitivana supstanca netoksična) može da se postavi granična studija, upotrebom 100 mg a.s./pčeli, da bi se pokazalo da LD50 prelazi ovu vrednost. Treba koristiti isti postupak, uključujući tri ispitivane grupe (replike) koje će se izložiti dozi, relevantne kontrolne grupe, procenu konzumirane količine tretirane hrane i upotrebu standarda toksičnosti. Ukoliko dođe do uginuća pčela, ispitivanje je neophodno izvesti u celosti, zabeleže se i subletalni efekti (videti odeljak 1.6.4. ove metode).

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

*2.1. PODACI*

Podaci se prikazuju u tabelarnoj formi. Za svaku ispitivanu grupu, bilo da je u pitanju kontrolna ili grupa standardne toksičnosti, navodi se broj ispitivanih jedinki, smrtnost u svakom izabranom trenutku opažanja, kao broj pčela sa neželjenim promenama u ponašanju. Podaci o smrtnosti se analiziraju pogodnim statističkim metodama (npr. probit-analizom, lutajućom srednjom vrednošću, binomnom verovatnoćom)**3,4**. Potrebno je grafički prikazati krive dozne zavisnosti za svaki preporučeni sat posmatranja, izračunati nagib krive i srednju letalnu dozu (LD50) sa 95% intervalom poverenja. Ispravke vezane za smrtnost u kontrolnoj grupi se mogu uraditi pomoću Abotove korekcije**4,5**. Ako tretirana hrana nije u potpunosti konzumirana, potrebno je odrediti dozu ispitivane supstance koju je zaista konzumirala svaka grupa. LD50 izraziti u mg ispitivane supstance po pčeli.

*2.2. IZVEŠTAJ*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1. ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i relevantna fizička i hemijska svojstva (npr. postojanost u vodi, napon pare);

- podaci od značaja za hemijsku identifikaciju supstance, uključujući strukturnu formulu, čistoću (npr. ako se radi o pesticidima, generički naziv i koncentraciju aktivnih supstanci).

2. ispitivanoj vrsti:

- latinski naziv, rod, približna starost (u nedeljama), metoda prikupljanja, datum prikupljanja;

- podaci o kolonijama iz kojih su sakupljene pčele, uključujući zdravstveno stanje u tim kolonijama, postojanje bilo kakve bolesti odraslih primeraka, bilo kakav prethodni tretman, itd.

3. uslovima u toku ispitivanja:

- temperatura i relativna vlažnost u laboratoriji;

- uslovi smeštaja ispitivanih jedinki, uključujući vrstu, veličinu kaveza i materijal od kojeg su napravljeni;

- metode pripreme osnovnog i ispitivanih rastvora (ukoliko se koristi nosač, navesti vrstu i koncentraciju);

- postavka ispitivanja, npr. broj korišćenih koncentracija i broj kontrola (broj kaveza replikata i broj pčela po kavezu za svaku koncentraciju i kontrolu);

- datum ispitivanja.

4. rezultatima:

- rezultati preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega doza, ako je rađeno;

- neobrađeni podaci - smrtnost u svakoj od ispitivanih koncentracija, u svakom satu opažanja;

- grafički prikaz krive dozne zavisnosti na kraju ispitivanja;

- vrednosti LD50, sa 95% intervalom poverenja, u svakom od preporučenih momenata opažanja, za ispitivanu supstancu i toksični standard;

- statističke metode korišćene za određivanje LD50;

- smrtnost u kontrolama;

- drugi primećeni ili izmereni biološki odgovori i bilo kakvo neuobičajeno ponašanje pčela (uključujući odbijanje hrane tretirane ispitivanom dozom), brzina potrošnje hrane u tretiranim i netretiranim grupama;

- bilo kakvo odstupanje od postupka ovde opisane metode ispitivanja i bilo kakvi drugi važni podaci.

**3. LITERATURA**

1. EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993. 31.5.2008 EN Official Journal of the European Union L 142/621

2. Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, p. 119-125.

3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

4. Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5. Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, p. 265-267.

**C.17. PČELE - ISPITIVANJE AKUTNE KONTAKTNE TOKSIČNOSTI**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 214 (1998).

*1.1. UVOD*

Ovo ispitivanje toksičnosti je laboratorijska metoda dizajnirana za procenu akutne kontaktne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih hemikalija na odrasle pčele-radilice.

Postupak procene i vrednovanja toksičnih svojstava supstanci može zahtevati utvrđivanje akutne kontaktne toksičnosti kod pčela, npr. u slučajevima kada je verovatno da će pčele biti izložene datoj hemikaliji. Ispitivanje akutne kontaktne toksičnosti izvodi se da bi se utvrdila svojstvena toksičnost pesticida i drugih hemikalija na pčele. Rezultati ovog ispitivanja koriste se za utvrđivanje potrebe za daljim postupanjem. Ova metoda je posebno pogodna kod etapnih programa za procenu opasnosti koju pesticidi predstavljaju za pčele, na osnovu hijerarhijskog redosleda, od laboratorijskih ispitivanja toksičnosti, do poluterenskih i terenskih ispitivanja1. Pesticidi se mogu ispitivati kao aktivne supstance (u daljem tekstu: a.s.) ili kao formulisani proizvodi.

Osetljivost pčela i preciznost postupka ispitivanja potvrditi primenom standardnih toksičnih supstanci.

*1.2. DEFINICIJE*

Akutna kontaktna toksičnost jesu štetne posledice koje se javljaju najkasnije 96 sati nakon kontaktne primene jednokratne doze ispitivane supstance

Doza jeste količina primenjene ispitivane supstance. Doza se izražava kao masa (mg) ispitivane supstance po jedinki (mg/pčele).

Kontaktna LD50 (srednja letalna doza)jeste statistički izvedena jednokratna doza supstance koja može izazvati smrt 50% životinja koje dođu u kontakt sa njom. Vrednost LD50 izražava se u (mg) ispitivane supstance po pčeli. Ako se ispituje dejstvo pesticida, ispitivana supstanca može biti aktivna supstanca ili formulisani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih supstanci.

Smrtnost jeste slučaj kada je jedinka potpuno nepomična i smatra se uginulom.

*1.3. PRINCIP METODE*

Odrasle pčele radilice (*Apis melifera*) izlažu se seriji doza ispitivane supstance, rastvorene u odgovarajućem nosaču, direktnim nanošenjem (kapljica) na grudni koš. Ispitivanje traje 48 sati. Ukoliko između 24 i 48 sata stopa smrtnosti raste, a u kontrolnoj grupi i dalje ostaje na prihvatljivom nivou, tj. < 10%, primereno je produžiti trajanje ispitivanja do najviše 96 sati. Smrtnost se beleži svakodnevno u toku najmanje 48 sati i poredi sa kontrolnim vrednostima. Rezultati ispitivanja se analiziraju, da bi se se izračunala vrednost LD50 nakon 24 i 48 sati, a u slučaju da je ispitivanje produženo i nakon 72 sata i 96 sati.

*1.4. KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, ispunjavaju se uslovi:

- prosečna smrtnost u kontrolnoj grupi ne prelazi 10% na kraju ispitivanja;

- LD50 standarda toksičnosti nalazi se u određenom opsegu.

*1.5. OPIS METODE*

**1.5.1. Sakupljanje pčela**

Koriste se mlade odrasle pčele radilice istog roda, tj. pčele jednake starosti, stanja uhranjenosti itd. Pčele se nabavljaju iz adekvatno hranjenih, zdravih kolonija, bez zabeleženih bolesti, koliko je moguće, ustrojenih po hijerarhijskom principu matice, poznatog pedigrea i fiziološkog statusa. Mogu se sakupiti onog jutra kada se planira početak ispitivanja, ili prethodno veče, pa se do sutradan drže u uslovima koji će vladati u toku ispitivanja. Prikladne su pčele sakupljene sa okvira na kojima nema jaja. Sakupljanje pčela u rano proleće ili kasnu jesen izbegavati, jer je njihova fiziologija u to vreme promenjena. Ako se ispitivanje izvodi u rano proleće ili kasnu jesen, pčele se mogu izleći u inkubatoru i othraniti nedelju dana "pčelinjim hlebom" (polenom sakupljenim iz saća) i rastvorom saharoze. Pčele tretirane hemijskim supstancama (antibiotici, proizvodi za uništavanje *Varroa* grinja) nije dozvoljeno koristiti za ispitivanje toksičnosti četiri nedelje nakon završetka poslednjeg tretmana.

**1.5.2. Uslovi smeštaja i ishrane**

Koriste se kavezi koji se lako čiste i dobro provetravaju. Mogu biti od bilo kog prikladnog materijala, npr. nerđajućeg čelika, žičane mreže, plastike, a mogu se koristiti i drveni kavezi za jednokratnu upotrebu, itd. Preporučuju se grupe od 10 pčela po kavezu. Veličina kaveza je primerena broju pčela, kako bi im se pružio odgovarajući prostor.

Pčele držati u tamnoj laboratoriji na temperaturi od 25° C ± 2° C. Relativnu vlažnost, koja uobičajeno iznosi oko 50% do 70%, beležiti u toku trajanja celog ispitivanja. Postupci rukovanja, uključujući tretman i beleženje zapažanja, mogu se obavljati na dnevnom svetlu. Kao hrana se koristi vodeni rastvor saharoze, krajnje koncentracije od 500 g/l (50% odnosa težine i zapremine, w/v). Nakon što su date doze, hranu davati neograničeno (*ad libitum*), koristeći hranilicu za pčele. Za tu namenu se može koristiti i staklena cevčica (dužine oko 50 mm, širine 10 mm, sa otvorenim krajem koji se sužava do promera od oko 2 mm).

**1.5.3. Priprema pčela**

Da bi se omogućilo nanošenje ispitivane supstance, sakupljene pčele se mogu anestezirati ugljen-dioksidom ili azotom. Količinu upotrebljenog anestetika i trajanje anestezije svesti na najmanju moguću meru. Pčele na umoru pre početka ispitivanja odbaciti i zameniti zdravim.

**1.5.4. Priprema doza**

Ispitivanu supstancu primeniti kao rastvor u nosaču, tj. rastvorenu u organskom rastvaraču ili vodi, uz sredstvo koje osigurava vlažnost. Kada je reč o organskom rastvaraču, prednost se daje acetonu, ali se mogu upotrebiti i drugi, po pčele netoksični organski rastvarači (npr. dimetilformamid, dimetilsulfoksid). Rastvori se mogu lakše naneti ako se pripreme u blagom rastvoru komercijalnog sredstva koje osigurava vlažnost (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween). Reč je o komercijalnim proizvodima dispergovanim u vodi i visokopolarnim organskim supstancama koje se ne rastvaraju u organskim rastvaračima,

Potrebno je pripremiti i pogodne kontrolne rastvore, tj. kod ispitivanja gde se za rastvaranje ispitivane supstance koristi rastvarač ili disperziono sredstvo, koristiti dve odvojene kontrolne grupe, jednu tretiranu vodom i drugu tretiranu rastvaračem/disperzionim sredstvom.

*1.6. POSTUPAK*

**1.6.1. Ispitivane i kontrolne grupe**

Broj ispitivanih doza i njihovih replika potrebno je da zadovoljava statističke zahteve u pogledu određivanja LD50 u intervalima poverenja od 95%. Obično se ispitivanje postavlja sa pet doza ispitivane supstance, u geometrijskoj seriji, sa faktorom ne većim od 2,2 tako da bude obuhvaćen opseg potreban za određivanje LD50. Faktor razblaženja i broj koncentracija za doziranje odrediti prema nagibu krive toksičnosti (doza prema smrtnosti), vodeći računa o zahtevima statističke metode odabrane za analizu rezultata. Preliminarna studija u cilju utvrđivanja opsega ispitivanih koncentracija omogućuje pravilan izbor ispitivanih koncentracija.

Minimalno tri grupe replika, svaka po deset pčela, izložiti dozama ispitivane supstance.

U svakom ispitivanju obezbediti najmanje tri kontrolne grupe sa po 10 pčela. Ako je korišćen neki organski rastvarač ili sredstvo koje osigurava vlažnost, uključiti još tri dodatne kontrolne serije sa po 10 pčela u svakoj od njih, koje će se tretirati samo rastvaračem, odnosno samo agensom koji osigurava vlažnost.

**1.6.2. Standard toksičnosti**

U ispitivane serije e uključiti i ispitivanje toksičnosti standarda. Da bi se obuhvatila očekivana vrednost LD50, odabrati najmanje tri doze standarda. Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu izložiti svakoj dozi standarda. Kao standard toksičnosti obično se koristi dimetoat, čija se LD50 nakon 24 sata peroralne primene kreće u opsegu od 0,10 mg do 0,35 mg a.s./pčeli2. Koriste se i drugi standardi toksičnosti, ako se raspolaže dovoljnom količinom podataka o očekivanoj doznoj zavisnosti (npr. paration).

**1.6.3. Izlaganje**

*1.6.3.1. Primena doza*

Anestezirane pčele, svaka individua pojedinačno, tretiraju se ispitivanom supstancom. Pčele se grupišu slučajnim rasporedom u ispitivane i kontrolne grupe i tretiraju različitim dozama ispitivane supstance. Po 1 ml rastvora koji sadrži ispitivanu supstancu u datoj koncentraciji potrebno je naneti mikroaplikatorom na dorzalnu stranu toraksa svake jedinke. Ako za to postoji opravdanje, mogu se upotrebiti i druge zapremine ispitivane supstance. Nakon nanošenja ispitivane supstance, pčele se stavljaju u kaveze i obezbedi im se rastvor saharoze.

*1.6.3.2. Dužina ispitivanja*

Preporučuje se da ispitivanje traje 48 sati. Ukoliko smrtnost između 24 i 48 sata nastavi da raste za više od 10%, ispitivanje produžiti do najviše 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolnim grupama ne prelazi 10%.

**1.6.4. Zapažanja**

Smrtnost se beleži 4 sata nakon primene ispitivane supstance, pa nakon 24 sata i 48 sati. Ukoliko se ukaže potreba da se ispitivanje produži, naredne procene obaviti u 24-satnim intervalima, najduže do ukupno 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolnim grupama ne prelazi 10%.

Potrebno je zabeležiti sve pojave neuobičajenog ponašanja tokom ispitivanja.

**1.6.5. Granična studija**

U nekim slučajevima (npr. kada se očekuje da je ispitivana supstanca netoksična) može se uraditi granična studija upotrebom 100 mg a.s./pčeli da bi se pokazalo da LD50 prelazi ovu vrednost. Treba koristiti isti postupak, uključujući tri ispitivane grupe (replike) koje se izlažu dozi, relevantne kontrolne grupe, procenu konzumirane količine tretirane hrane i upotrebu standarda toksičnosti. Ukoliko dođe do uginuća pčela, ispitivanje je neophodno izvesti u celosti. Ako se uoče subletalni efekti (videti odeljak 1.6.4. ove metode) zabeležiti ih.

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

*2.1. PODACI*

Podaci se prikazuju u tabelarnoj formi. Za svaku ispitivanu grupu, bilo da je u pitanju kontrolna ili grupa standardne toksičnosti, navodi se broj ispitivanih jedinki, smrtnost u svakom izabranom trenutku opažanja, kao broj pčela sa neželjenim promenama u ponašanju. Podaci o smrtnosti se analiziraju pogodnim statističkim metodama (npr. probit-analizom, lutajućom srednjom vrednošću, binomnom verovatnoćom)**3,4**. Potrebno je grafički prikazati krive dozne zavisnosti za svaki preporučeni sat posmatranja, izračunati nagib krive i srednju letalnu dozu (LD50) sa 95% intervalom poverenja. Ispravke vezane za smrtnost u kontrolnoj grupi se mogu uraditi pomoću Abotove korekcije4**,5**. Ako tretirana hrana nije u potpunosti konzumirana, potrebno je odrediti dozu ispitivane supstance koju je zaista konzumirala svaka grupa. LD50 izraziti u mg ispitivane supstance po pčeli.

*2.2. IZVEŠTAJ*

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i relevantna fizička i hemijska svojstva (npr. postojanost u vodi, napon pare);

- podaci od značaja za hemijsku identifikaciju supstance, uključujući strukturnu formulu, čistoću (npr. ako se radi o pesticidima, generički naziv i koncentraciju aktivnih supstanci).

2) ispitivanoj vrsti:

- latinski naziv, rod, približna starost (u nedeljama), metoda prikupljanja, datum prikupljanja;

- podaci o kolonijama iz kojih su sakupljene pčele, uključujući zdravstveno stanje kolonija, prisustvo bolesti kod odraslih primeraka, bilo kakav prethodni tretman, itd.

3) uslovima tokom ispitivanja:

- temperatura i relativna vlažnost u laboratoriji;

- uslovi smeštaja ispitivanih jedinki, uključujući vrstu, veličinu kaveza i materijal od kojeg su napravljeni;

- metode primene ispitivane supstance, npr. korišćen rastvarač - nosač, primenjena zapremina rastvora, korišćeni anestetici;

- postavka ispitivanja, npr. broj korišćenih koncentracija i broj kontrola (broj kaveza replikata i broj pčela po kavezu za svaku koncentraciju i kontrolu);

- datum ispitivanja.

4) rezultatima:

- rezultati preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega doza, ako je rađena;

- neobrađeni podaci - smrtnost u svakoj od ispitivanih koncentracija, u svakom satu opažanja;

- grafički prikaz krive dozne zavisnosti na kraju ispitivanja

- vrednosti LD50, sa 95% intervalom poverenja, u svakom od preporučenih momenata opažanja, za ispitivanu supstancu i toksični standard;

- statističke metode korišćene za određivanje LD50;

- smrtnost u kontrolama;

- drugi biološki odgovori i bilo kakvo neuobičajeno ponašanje pčela;

- bilo kakvo odstupanje od postupka ovde opisane metode ispitivanja i drugi bitni podaci.

**3. LITERATURA**

1. EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment ofPlant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March, 1993.

2. Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound inlaboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of ApiculturalResearch 22, p. 119-125.

3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour.Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

4. Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5. Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, p. 265-267.

**C.18. ADSORPCIJA /DESORPCIJA POMOĆU METODE RAVNOTEŽENOG STANJA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 106, u delu koji se odnosi na utvrđivanje adsorpcije/desorpcije na čestice zemljišta pomoću metode ravnotežnog stanja**XVII**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVII** Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method (2000)

*1.1. UVOD*

Metoda ispitivanja uzima u obzir međulaboratorijsko poređenje i radionicu na temu izbora zemljišta za razvoj metode ispitivanja adsorpcije**1,2,3,4**, kao i postojeće smernice na nacionalnom nivou**5,6,7,8,9,10,11**.

Studije adsorpcije/desorpcije korisne su kao izvor ključnih podataka o kretanju hemikalija i njihovoj raspodeli u zemljištu, vodi i vazduhu kao delovima biosfere**12,13,14,15,16,17,18,19,20,21**. Podaci se mogu upotrebiti za predviđanje i utvrđivanje, npr. dostupnosti hemikalije za razgradnju**22,23**, njene transformacije i unosa u organizme**24**, ispiranja i proceđivanja kroz različite profile zemljišta**16,18,19,21,25,26,27,28**, isparavanja iz zemljišta**21,29,30** i oticanja sa zemljišnih površina u vode**18,31,32**. Podaci o adsorpciji mogu se koristiti za poređenje i modelovanje**19,33,34,35**.

Raspodela hemikalije između čvrste i tečne faze složen je proces, koji zavisi od brojnih različitih faktora: hemijske prirode supstance**12,36, 7,38,39,40** karakteristika zemljišta**4,12,13,14,41,42,43,44,45,46,47,48,49** i klimatskih faktora kao što su padavine, temperatura, sunčeva svetlost i vetar. Zbog toga se brojne pojave i mehanizmi uključeni u proces adsorpcije hemikalija u zemljištu ne mogu u potpunosti definisati pojednostavljenim laboratorijskim modelom, kakav predstavlja ova metoda. Iako ovaj pokušaj ne može pokriti sve slučajeve koji se u prirodi mogu dogoditi, on pruža vredne podatke o ekološkom značaju procesa adsorpcije hemikalije.

Videti Opšti uvod.

*1.2. OBLAST PRIMENE*

Metoda se koristi za procenu ponašanja hemikalije u različitim zemljištima, u smislu njene adsorpcije/desorpcije na čestice zemljišta. Cilj je dobijanje sorpcione vrednosti koja se može koristiti za predviđanje raspodele supstance u različitim ekološkim uslovima. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da su ravnotežni adsorpcioni koeficijenti hemikalije u različitim tipovima zemljišta u funkciji karakteristika zemljišta (npr. sadržaj organskog ugljenika, ilovače, tekstura i pH vrednost zemljišta). Da bi se u najširem smislu obuhvatile sve interakcije određene supstance i različitih tipova zemljišta prirodnog porekla, za ispitivanje se koriste različiti tipovi uzoraka zemljišta.

U okviru ove metode, adsorpcija predstavlja proces vezivanja hemikalije za površine zemljišta. Njome se ne mogu utvrditi razlike između različitih procesa adsorpcije (fizička i hemijska adsorpcija), niti procesi poput površinski katalizirane razgradnje, masivne adsorpcije i hemijske reakcije.

Adsorpcija na koloidne čestice (prečnika < 0,2 µm) koje stvara zemljište nije uzeta u obzir.

Svojstva zemljišta za koja se smatra da su najvažnija za adsorpciju su:

- sadržaj organskog ugljenika u zemljištu**3,4,12,13,14,41,43,44,45,46,47,48**;

- sadržaj ilovače u zemljištu i tekstura zemljišta**3,4,41,42,43,44,45,46,47,48** i

- pH vrednost jedinjenja podložnih jonizaciji**3,4,42**.

Druga svojstva zemljišta koja mogu imati uticaja na adsorpciju/desorpciju određene supstance su:

- efektivni kapacitet izmene katjona (Effective Cation Exchange Capacity, u daljem tekstu: ECEC);

- sadržaj amorfnog gvožđa i aluminijumovih oksida, naročito u vulkanskim i tropskim zemljištima**4** i

- specifična površina zemljišta**49**.

Metoda ispitivanja je osmišljena tako da omogući vrednovanje adsorpcije hemikalije na različite vrste zemljišta, u odnosu na sadržaj ugljenika, ilovače, teksturu, kao i pH vrednost.

Ispitivanje obuhvata tri etape:

1) prva etapa je preliminarna studija kojom se utvrđuje:

- odnos zemljišta i rastvora;

- vreme potrebno za dostizanje ravnotežnog stanja adsorpcije;

- količina ispitivane supstance koja se adsorbovala u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja;

- adsorpcija ispitivane supstance na površine posuda i stabilnost ispitivane supstance za vreme trajanja ispitivanja;

2) druga etapa je skrining test:

- adsorpcija se proučava na pet različitih vrsta zemljišta (pomoću kinetike adsorpcije pri jednoj jedinoj koncentraciji i određivanjem koeficijenta raspodele Kd i Koc);

3) treća etapa:

- određivanje Frojndlihovih adsorpcionih izotermi radi utvrđivanja uticaja koncentracije na stepen adsorpcije na čestice zemljišta (studija desorpcijena osnovu kinetike desorpcije/Frojndlihove desorpcione izoterme - videti Deo drugi ove metode).

*1.3. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Simbol | Definicija | Jedinica |
| Ati | procenat adsorpcije u vremenu ti | % |
| Aeq | procenat adsorpcije kod ravnotežnog stanja adsorpcije | % |
| msads(ti) | masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenu ti | g |
| msads (∆ti) | masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenskom intervalu ∆ti | mg |
| msads (eq) | masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u ravnotežnom stanju adsorbcije | mg |
| m0 | masa ispitivane supstance u ispitivanoj posudi na početku ispitivanja adsorpcije | mg |
| mmads (ti) | masa ispitivane supstance izmerena u alikvotima (VaA) u tački vremena ti | mg |
| maqads (eq) | masa supstance u rastvoru pri ravnotežnom stanju adsorpcije | mg |
| mzemljišta | količina zemljišta faze, izražena kao suva masa zemljišta | g |
| Cst | masena koncentracija osnovnog rastvora supstance | mg/cm3 |
| C0 | početna masena koncentracija ispitivanog rastvora u dodiru sa zemljištem | mg/cm3 |
| caqads (ti) | masena koncentracija supstance u tečnoj fazi u vremenu ti u kojem se obavlja analiza | mg/cm3 |
| csads (eq) | sadržaj supstance adsorbovane na zemljište pri ravnotežnom stanju adsorbvcije | mg/g |
| caqads (eq) | masena koncentracija supstance u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju adsorpcije | mg/cm3 |
| V0 | Početna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem za vreme ispitivanja adsorpcije | cm3 |
| VaA | zapremina alikvota u kojima se meri ispitivana supstanca | cm3 |
| Kd | koeficijent raspodele adsorpcije | cm3/g |
| Koc | normalizovan koeficijent adsorpcije organskog ugljenika | cm3/g |
| Kom | normalizovan koeficijent raspodele organske materije | cm3/g |
| KFads | Frojndlihova adsorpciona konstanta | g-1-1/n (cm3)1/ng-1 |
| 1/n | Frojndlihov eksponent | / |
| Dti | procenat desorpcije u vremenu ti | % |
| D∆ti | procenat desorpcije u vremenskom intervalu ∆ti | % |
| Kdes | Očigledna prividna desorpciona konstanta | cm3/g |
| KFdes | Frojndlihova desorpciona konstanta | g-1-1/n (cm3)1/ng-1 |
| maqdes(ti) | masa ispitivane supstance desorbovane iz zemljišta u vremenu ti | g |
| mmdes(∆ti) | masa ispitivane supstance desorbovane iz zemljišta za vreme ∆ti | g |
| mmads (eq) | masa supstance analitički određena u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju desorpcije | g |
| maqads (eq) | ukupna masa ispitivane supstance desorbovana pri ravnotežnom stanju desorpcije | g |
| msdes(∆ti) | masa supstance koja ostaje adsorbovana na zemljištu nakon vremenskog intervala ∆ti | g |
| maqA | masa ostatka supstance nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije zbog nepotpune zamene zapremine | g |
| Csdes(eq) | sadržaj ispitivane supstance koji je ostao adsorbovan na zemljište kod ravnotežnog stanja desorpcije | g/cm |
| Caqdes(eq) | masena koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju desorpcije | g/cm3 |
| VT | ukupna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem u toku kinetike desorpcije, urađena rednom metodom | cm3 |
| VR | zapremina supernatanta uklonjenog iz epruvete (nakon uspostavljenog ravnotežnog stanja adsorpcije) i zamenjenog istom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 | cm3 |
| vaD | zapremina alikvota uzetih u analitičke svrhe u vremenu (i), u toku studija kinetike desorpcije urađene rednom metodom | cm3 |
| Vri | zapremina rastvora uzetog iz *i*-teepruvete za merenje ispitivane supstance, u studijama kinetike desorpcije (paralelna metoda) | cm3 |
| VrF | zapremina rastvora uzetog iz epruvete za merenje ispitivane supstance, u trenutku uspostavljanja ravnotežnog stanja desorpcije | cm3 |
| MB | maseni balans | % |
| mE | ukupna masa ispitivane supstance ekstrahovana iz zemljišta i sa zidova posude za ispitivanje u dve etape | g |
| Vrec | zapremina supernatanta uzetog nakon uspostavljanja ravnoteže adsorpcije | cm3 |
| Pow | koeficijent raspodele u sistem *n*-oktanol/voda | / |
| pKa | konstanta disocijacije | / |
| Sw | rastvorljivost u vodi | g/l |

*1.4. PRINCIP METODE*

Poznata zapremina rastvora ispitivane supstance neobeležene ili obeležene radioizotopom i zastupljene u 0,01 M rastvoru CaCl2 u poznatim koncentracijama, dodaje se uzorcima zemljišta poznate suve mase, prethodno uravnoteženim u 0,01 M rastvoru CaCl2. Smeša se dovoljno dugo protresa. Suspenzija zemljišta se zatim odvoji centrifugiranjem i ako se želi, filtracijom, a zatim se tečna faza podvrgava analizi. Količina ispitivane supstance adsorbovana na uzorak zemljišta, izračunava se kao razlika između količine ispitivane supstance koja se prvobitno nalazila u rastvoru i količine koja je ostala na kraju ispitivanja (indirektna metoda).

Moguće je i da se adsorbovana količina ispitivane supstance odredi direktno, analizom zemljišta (direktna metoda). Ovaj postupak, koji uključuje postepenu ekstrakciju zemljišta odgovarajućim rastvaračem, preporučuje se u slučajevima kada se razlika u koncentraciji ispitivane supstance u rastvoru ne može tačno odrediti. Primeri ovakvih slučajeva su: adsorpcija ispitivane supstance na površinu ispitivanih posuda, nestabilnost ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se sprovede ispitivanje, slaba adsorpcija koja rezultira neznatnom promenom koncentracije ispitivane supstance u rastvoru, ili jaka adsorpcija, koja rezultira tako niskom koncentracijom ispitivane supstance u rastvoru da se ne može tačno odrediti. Ako se ispitivana supstanca obeleži radioizotopom, ekstrakciju zemljišta moguće je izbeći analizom čvrste faze, sagorevanjem i brojanjem pomoću tečnog scintilacionog brojača. Brojanje tečnim scintilacionim brojačem nespecifična je tehnika kojom se ne mogu razlikovati početne supstance od produkata transformacije; pa je koristiti isključivo ukoliko je ispitivana hemikalija stabilna u toku studije.

*1.5. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Hemijski reagensi su analitičke čistoće. Preporučuje se upotreba neobeležene ispitivane supstance poznatog sastava i ako je moguće, hemijske čistoće od najmanje 95%, ili upotreba radioizotopom obeležene ispitivane supstance poznatog sastava i radiološke čistoće. Ako se koriste kratkoživeći radioizotopi, učiniti korekcije s obzirom na njihovo vreme poluraspada.

Pre izvođenja ispitivanja adsorpcije/desorpcije potrebno je da budu dostupni sledeći podaci o ispitivanoj supstanci:

- rastvorljivost u vodi (videti Metodu A.6. koja je data u ovom pravilniku);

- napon pare ispitivane supstance (videti Metodu A.4. koja je data u ovom pravilniku), odnosno Henrijeva konstanta;

- abiotička razgradnja, odnosno hidroliza kao funkcija pH vrednosti (videti Metodu C.7. koja je data u ovom prilogu);

- koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda (videti Metodu A.8. koja je data u ovom pravilniku);

- brza biorazgradljivost (videti Metodu C.4. koja je data u ovom prilogu), odnosno aerobna i anaerobna transformacija u zemljištu;

- pKa supstanci podložnih jonizaciji;

- direktna fotoliza u vodi (tj. UV-vis apsorpcioni spektar u vodi, kvantni doprinos) i fotorazgradnja na zemljištu.

*1.6. PRIMENLJIVOST METODE*

Metoda ispitivanja je primenljiva za ispitivanje hemijskih supstanci za koje je dostupna analitička metoda zadovoljavajuće tačnosti. Važan parametar, koji može uticati na pouzdanost rezultata, posebno ako se koristi indirektna metoda, je stabilnost ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se ispitivanje izvede. Kao preduslov za izvođenje ovakvog ispitivanja proveriti stabilnost ispitivane supstance u preliminarnoj studiji. Ako se primeti da je došlo do transformacije ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se ispitivanje izvrši, preporučuje se da se glavno ispitivanje izvede tako da se analizira i čvrsta i tečna faza.

Teškoće se mogu javiti ako se ovom metodom ispituju supstance slabo rastvorljive u vodi (Sw od 10 g/l do 4 g/l), kao i supstance visokog naboja i to zbog toga što se koncentracije ovakvih supstanci u tečnoj fazi ne mogu dovoljno tačno analitički izmeriti. U ovakvim slučajevima preduzeti dodatne korake. Uputstvo o tome kako rešiti ovakve probleme dato je u ovoj metodi.

Ako se ispituju isparljive supstance, preduzimaju se mere opreza kako bi se u toku studije izbegli gubici.

*1.7. OPIS METODE*

**1.7.1. Aparatura i hemijski reagensi**

Oprema za ispitivanje sadrži standardnu laboratorijsku aparaturu, a posebno:

1) kivete, odnosno posude u kojima će se izvesti ispitivanje i koje:

- staju direktno u centrifugu kako bi se greške nastale prilikom rukovanja i prenošenja uzoraka svele na minimum;

- su od inertnog materijala, čime se adsorpcija ispitivane supstance na njihove površine svodi na najmanju moguću meru;

2) uređaj za mešanje

- dodatni vibracioni uređaj (shaker ili Vortex) ili ekvivalentna oprema (za vreme protresanja u uređaju zemljište ostaje suspendovano);

3) centrifugu

- ako je moguće velike brzine (npr. sile centrifugiranja > 3000 g), termostatirana, sposobna da iz vodenog rastvora ukloni čestice prečnika većeg od 0,2 μm. Tokom protresanja i centrifugiranja posude za ispitivanje su zatvorene, da bi se izbeglo isparavanje i gubitak vode. Potrebno je upotrebiti deaktivirane čepove (npr. navojni čepovi od teflona) kako bi se adsorpcija na čepove svela na minimum;

4) uređaj za filtraciju (opciono)

- filteri promera 0,2 µm, sterilni, za jednokratnu upotrebu. Posebnu pažnju posvetiti izboru materijala za filtere, kako bi se izbegli gubici ispitivane supstance na njima. Za slabo rastvorljive ispitivane supstance ne preporučuje se upotreba filtera od organskog materijala;

5) analitički uređaji

- prikladni za merenje koncentracije ispitivane hemikalije;

6) laboratorijska sušnica

- u stanju da održava temperaturu (termostat) od 103° C do 110° C.

**1.7.2. Karakterizacija i izbor zemljišta**

Zemljište okarakterisati sa tri parametra za koje se smatra da su u velikoj meri odgovorni za adsorpcijski kapacitet: sadržajem organskog azota, ilovače, teksturom zemljišta i pH vrednošću. Kako je ranije napomenuto (videti odeljak 1.2. ove metode), na adsorpciju/desorpciju određene supstance utiču i druga fizička i hemijska svojstva, koja se u ovakvim slučajevima uzimaju u obzir.

Metode karakterizacije zemljišta od izuzetne su važnosti i mogu imati značajan uticaj na rezultate. Preporuka je da se pH zemljišta izmeri u 0,01 M rastvoru CaCl2 (rastvor koji se koristi pri ispitivanju adsorpcije/desorpcije) u skladu sa odgovarajućom ISO metodom (ISO-10390-1). Ostala relevantna svojstva zemljišta preporučljivo je odrediti u skladu sa standardnim metodama (npr. ISO "Priručnik za analizu zemljišta"). Ovo omogućava da analiza podataka o adsorpciji u zemljištu bude bazirana na parametrima kvaliteta zemljišta standardizovanim na međunarodnom nivou. Neka uputstva i smernice u pogledu postojećih standardnih metoda analize zemljišta navedeni su u literaturi 50-52. Radi kalibracije metoda ispitivanja zemljišta preporučljivo je koristiti referentna zemljišta.

Smernice u pogledu izbora različitih tipova zemljišta za ispitivanje adsorpcije/desorpcije, date su u Tabeli 1. Sedam odabranih tipova zemljišta pokriva vrste zemljišta sa kojima se susreće u geografskim područjima umerenog klimatskog pojasa. Ako se ispituju supstance podložne jonizaciji, odabrani tipovi zemljišta pokrivaju širok opseg pH vrednosti, kako bi se vrednovala adsorpcija jonizovanog i nejonizovanog oblika supstance. Smernice u pogledu toga koliko različitih tipova zemljišta se koristi u različitim fazama ispitivanja, date su u odeljku 1.9. ove metode.

Ako se prednost daje drugim vrstama zemljišta, bliže ih označiti istim parametrima kao i zemljišta navedena u Tabeli 1, čak i ako u potpunosti ne zadovoljavaju kriterijume. Varijabilnost njihovih svojstava je jednaka.

Tabela 1: Smernice u pogledu izbora uzoraka zemljišta za ispitivanje adsorpcije/desorpcije

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tip  zemljišta | pH opseg  (u 0,01 M CaCl2) | Sadržaj organskog ugljenika (%) | Sadržaj gline (%) | Tekstura zemljišta**XVIII** |
| 1 | 4,5-5,5 | 1,0-2,0 | 65-80 | glina |
| 2 | > 7,5 | 3,5-5,0 | 20-40 | glinovita ilovača |
| 3 | 5,5-7,0 | 1,5-3,0 | 15-25 | muljevita ilovača |
| 4 | 4,0-5,5 | 3,0-4,0 | 15-30 | ilovača |
| 5 | < 4,0 - 6,0**73** | < 0,5-1,5**XVII,XX** | < 10-15**XVI** | ilovačasti pesak |
| 6 | > 7,0 | < 0,5-1,0**XVII,XVIII** | 40-65 | glinovita ilovača/ glina |
| 7 | < 4,5 | > 10 | < 10 | pesak / ilovačasti pesak |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XVIII** Prema FAO i US sistemu**85**.  
**XIX** Promenljive bi trebale pokazivati vrednosti unutar datog opsega. Ako se pojave poteškoće u nalaženju odgovarajućeg zemljišnog materijala, prihvatljive su vrednosti ispod navedenog minimuma.  
**XX** Zemljišta sa udelom organskog ugljenika manjim od 0,3% mogu smetati u korelaciji između sadržaja organske materije i adsorpcije. Zbog toga se preporučuje upotreba zemljišta sa sadržajem organskog ugljenika od 0,3%.

**1.7.3. Sakupljanje i čuvanje uzoraka zemljišta**

*1.7.3.1. Sakupljanje*

Ne preporučuje se upotreba posebne tehnike ni alata za uzimanje uzorka zemljišta. Tehnika zavisi od cilja studije.

Uzeti u obzir:

- da je potrebno raspolagati detaljnim podacima o terenskom lokalitetu. Ovo uključuje lokaciju, biljni pokrivač, tretmane pesticidima, odnosno đubrivima, biološke dodatke i slučajno zagađenje. U pogledu opisa lokaliteta sa koga se uzimaju uzorci, potrebno je pridržavati se preporuka sadržanih u ISO-standardu za uzimanje uzoraka zemljišta (ISO 10381-6);

- da se lokalitet sa kojeg se uzimaju uzorci definiše pomoću UTM mreže (Universal Transversal Mercator-Projection/ European Horizontal Datum), ili geografskih koordinata. Ovo može omogućiti da se uzorak zemljišta ubuduće ponovo uzme sa istog lokaliteta, ili može pomoći da se zemljište definiše u različitim klasifikacionim sistemima, korišćenim u različitim zemljama. Uzorke zemljišta prikupljati isključivo iz horizonta A, na dubini do najviše 20 cm, naročito ako se radi o zemljištu tipa broj 7. Ako u zemljištu kao integralni deo postoji sloj Oh, uzorak uzeti i iz ovog horizonta.

Uzorke tla prevesti u kontejnerima i pod temperaturnim uslovima koji obezbeđuju da se prvobitna svojstva zemljišta neće značajno promeniti.

*1.7.3.2. Skladištenje*

Prednost se daje upotrebi uzoraka zemljišta neposredno uzetih sa terena. Samo u slučaju kada to nije moguće, uzorci zemljišta skladište se na ambijentalnoj temperaturi, s tim da se spreči isušivanje na vazduhu. Preporuka u pogledu ograničenja trajanja skladištenja nema, ali se uzorci zemljišta skladišteni duže od tri godine pre upotrebe ponovo analiziraju, kako bi se utvrdio sadržaj ugljenika, pH i CEC.

*1.7.3.3. Rukovanje uzorcima zemljišta i njihova priprema za ispitivanje*

Uzorke zemljišta osušiti na vazduhu, na ambijentalnoj temperaturi (ako je moguće između 20° C i 25° C). Uzorke zemljišta nežno rastresti, primenom najmanje moguće sile, da se što je manje moguće promeni izvorna tekstura zemljišta. Uzorci zemljišta se prosejavaju do čestica veličine ≤ 2 mm. Kod procesa prosejavanja, pridržavati se preporuka sadržanih u ISO standardu za uzimanje uzoraka zemljišta (ISO 10381-6). Preporučuje se da se uzorci pažljivo homogenizuju, jer to poboljšava ponovljivost rezultata. Sadržaj vlage u svakom tipu zemljišta određuje se u tri alikvota, sušenjem na 105 °C dovoljno dugo dok značajne promene u težini više nema (oko 12 sati). U svim izračunavanjima pojam mase zemljišta odnosi se na u sušilici postignutu suvu masu, tj. na težinu zemljišta korigovanu u odnosu na sadržaj vlage.

**1.7.4. Priprema ispitivane supstance za nanošenje na zemljište**

Ispitivana supstanca se rastvori u 0,01 M rastvoru CaCl2 u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi. Da bi se centrifugiranje poboljšalo, a izmena katjona svela na najmanju moguću meru, rastvor CaCl2 se koristi kao tečna faza rastvarača. Koncentracija osnovnog rastvora je, ako je moguće, tri reda veličine veća od granice detekcije upotrebljene analitičke metode. Ovakav prag obezbeđuje tačnost merenja metodologijom uobičajenom za ovu metodu ispitivanja. Koncentracija osnovnog rastvora je niža od rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi.

Osnovni rastvor, ako je moguće, pripremiti neposredno pre nanošenja na uzorke zemljišta i čuvati zatvoren u mraku na temperaturi od 4 °C. Trajanje skladištenja zavisi od stabilnosti ispitivane supstance i njene koncentracije u rastvoru.

Samo kod teško rastvorljivih supstanci (Sw< 10-4 g/l) može se ukazati potreba za upotrebom adekvatnog sredstva koje olakšava rastvaranje ispitivane supstance. Ovo sredstvo:

1. se meša sa vodom, kao što je to slučaj kod metanola ili acetonitrila,

2. njegova koncentracija ne prelazi 1% ukupne zapremine osnovnog rastvora, a udeo je manji od onoga u rastvoru ispitivane supstance koja dolazi u dodir sa zemljištem (ako je moguće manji 0,1%) i

3. nije surfaktant, niti podleže solvolitičkim reakcijama sa ispitivanom hemikalijom.

U izveštaju navesti i opravdati upotrebu sredstva koje olakšava rastvaranje.

Druga mogućnost, koja stoji na raspolaganju kada su u pitanju teško rastvorljive supstance, je da se u sistem za ispitivanje supstanca doda režimom pulsacije. Ispitivana supstanca se rastvori u organskom rastvaraču, a potom se alikvot tog rastvora doda u sistem zemljišta i 0,01 M rastvor CaCl2 u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi. Udeo organskog rastvarača u tečnoj fazi održavati što je moguće manjim, u uobičajenim okolnostima ne višim od 0,1%. Problem koji se pri ovakvom načinu rada može javiti jeste nemogućnost da se pri sledećem dodavanju ponovno doda ista zapremina. Ovakvo dodavanje ispitivane supstance iz organskog rastvora može dovesti do dodatne greške, zbog toga što se može desiti da koncentracije ispitivane supstance i dodatnog rastvarača u svim ispitivanjima ne budu iste.

*1.8. PREDUSLOVI ZA PRIMENU METODE ISPITIVANJA ADSORPCIJE/DESORPCIJE*

**1.8.1. Analitička metoda**

U ključne parametre koji mogu uticati na tačnost merenja adsorpcije spadaju: tačnost analitičke metode upotrebljene za analizu rastvora i za analizu adsorbovane faze; stabilnost i hemijska čistoća ispitivane supstance; postizanje adsorpcione ravnoteže; veličina promena u koncentraciji rastvora, odnos zemljišta i rastvora, kao i promene u strukturi zemljišta do kojih je došlo u toku procesa dostizanja ravnoteže**35,59,60,61,62**. Primeri u kojima se daju podaci o tačnosti, navedeni su u Delu drugom ove metode.

Pouzdanost upotrebljene analitičke metode proveriti u opsegu koncentracija za koji je verovatno da će biti primenjen u ispitivanju. Lice koje izvodi ispitivanje ima slobodu da razvije adekvatnu metodu, zadovoljavajuće tačnosti, preciznosti, ponovljivosti, granica detekcije i efikasnosti. Smernice kako izvesti ovakvo ispitivanje navedene su u ovoj metodi.

Adekvatna zapremina 0,01 M rastvora CaCl2, npr. 100 cm3, protrese se u toku 4 sata sa nešto zemljišta, npr. 20 g zemljišta visoke moći adsorpcije, tj. visokog sadržaja ugljenika i ilovače. U zavisnosti od analitičkih potreba, ove težine i zapremine mogu varirati, ali primerenu ishodišnu tačku čini odnos zemljišta i rastvora od 1:5. Smeša se centrifugira, a tečna faza se može i filtrirati. Kako bi se postiglo da nominalna koncentracija ispitivane supstance bude unutar opsega koncentracija za koji je verovatno da će u toku ispitivanja biti aktuelan, u tečnu fazu se dodaje izvesna zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance. Ova zapremina ne sme prelaziti 10% konačne zapremine tečne faze, kako bi promena prirode rastvora kojom se raspolaže pre postizanja ravnotežnog stanja, bila što manja. Nakon toga rastvor se analizira.

Da bi se proverilo da li u analitičkoj metodi postoje artefakti, kao i za efekte matriksa uzrokovanog zemljišta, potrebno je ispitati i jedan kontrolni uzorak, koji se sastoji od sistema zemljišta i rastvora CaCl2 (bez ispitivane supstance).

U analitičke metode koje se mogu upotrebiti za merenja sorpcije, spadaju gasno-tečna hromatografija (*gas-liquid chromatography*, u daljem tekstu: GLC), tečna hromatografija visokih performansi (*high-performance liquid chromatography*, u daljem tekstu: HPLC), spektrometrija (npr. GC/masena spektrometrija, HPLC/masena spektrometrija) i brojanje pomoću tečnih scintilacionih brojača (kod ispitivanja supstanci obleženim radioizotopom). Nezavisno od analitičke metode koja se upotrebi, zadovoljavajuća efikasnost analitičke tehnike je potrebno da bude između 90% i 110% nominalne vrednosti. Da bi detekcija i vrednovanje usledili nakon raspodele, granice detekcije upotrebljene analitičke metode su najmanje dva reda veličine niže od nominalne koncentracije ispitivane supstance.

Svojstva i granice detekcije analitičke metode odabrane za proučavanje adsorpcije imaju važnu ulogu u definisanju ispitivanja uslova, kao i u celokupnoj postavci. Ova metoda sledi opšti tok ispitivanja i daje preporuke i smernice za alternativna rešenja kojima se pribegava u slučajevima kada analitička metoda i opremljenost laboratorije mogu nametnuti izvesna ograničenja.

**1.8.2. Izbor optimalnog odnosa zemljište/rastvor**

Izbor odnosa zemljišta i rastvora primerenih za izučavanje sorpcije zavisi od koeficijenta raspodele Kd, kao i od toga koji se relativni stepen adsorpcije želi postići. S obzirom na oblik jednačine adsorpcije i domet analitičke metodologije, pri određivanju koncentracije hemikalije u rastvoru, statističku tačnost merenja određuje promena te koncentracije. Stoga je u rutinskoj praksi korisno uspostaviti nekoliko fiksnih odnosa, pri kojima je procenat adsorpcije viši od 20%, a ako je moguće i viši od 50%**62**, pri čemu paziti da se koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi održava dovoljno visokom da se može tačno izmeriti. Ovo je naročito važno u slučaju kada se adsorpcija zbiva u visokim procentima.

Praktičan pristup izboru dobrog odnosa zemljište/voda utemeljen je na utvrđivanju Kd vrednosti preliminarnim studijama ili utvrđenim tehnikama (videti Deo četvrti ove metode). Adekvatan odnos može se odabrati na osnovu krive na kojoj je, za fiksne procente adsorpcije, odnos zemljišta i rastvora prikazan u odnosu na Kd (Slika 1). Ova kriva se bazira na pretpostavci da je jednačina adsorpcije linearna**XXI**. Primenljiv odnos se dobija prepravkom jednačine [4] od Kd, u oblik jednačine[1]:

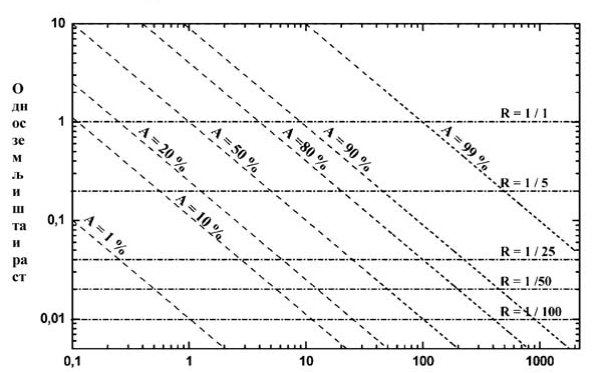
|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | = | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s088.gif |  | -1 | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s089.gif | Kd | 1 |
| V0 | mo |
| msoi | msads(eq) |
|  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ili u njenom logaritamskom obliku, uz pretpostavku da je R = | m zemljišta | i |
| V0 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Aeq % | = | msads(eq) | ; |
| 100 | m0 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| log R = - log Kd + log |  | (Aeq %/100) |  | 2 |
| 1 - Aeq%/100) |

Slika 1: Odnos zemljišta i rastvora i Kd pri različitim procentima adsorpcije ispitivane supstance



**Koeficijent raspodele Kd (cm3 g-1)**

Potrebni odnosi količina zemljišta i rastvora prikazani su na Slici 1 kao funkcija Kd, i to pri različitim nivoima adsorpcije. Na primer, pri odnosu zemljišta i rastvora od 1:5 i vrednosti Kd od 20, adsorbovaće se približno 80% ispitivane supstance. Da bi se pri istom Kd dobila adsorpcija od 50%, potrebno je upotrebiti odnos od 1:25. Ovaj pristup izboru pogodnih odnosa zemljišta i rastvora istraživaču omogućuje fleksibilnost potrebnu da zadovolji zahteve ispitivanja.

Problem koji je teže rešiv odnosi se na situaciju kada se hemikalija izuzetno dobro ili neznatno adsorbuje. Kad je adsorpcija slaba, preporučuje se upotreba odnosa zemljišta i rastvora od 1:1, iako kada su u pitanju neke izrazito organske vrste zemljišta, dobijanje žitkog, gustog rastvora može iziskivati i manje razmere. Pažnju usmeriti na to da izabranom analitičkom metodologijom bude moguće izmeriti male promene u koncentraciji rastvora. U suprotnom bi merenje adsorpcije bilo netačno. Kako bi u rastvoru ostala značajna količina hemikalije, pri vrlo visokim koeficijentima raspodele (Kd) odnos zemljišta i rastvora može doći i do 1:100. Treba obezbediti dobro mešanje zemljišta i rastvora i da se sistemu ostavi odgovarajuće vreme da se uravnoteži. Alternativni pristup tome kako se nositi sa ovakvim ekstremnim slučajevima, za koje nema odgovarajuće metodologije, je da se vrednost Kd predvidi primenom tehnika procene baziranim, npr. na vrednostima Kow (videti Deo četvrti ove metode). Ovo može biti korisno ako se ispituju neznatno adsorbovane/polarne hemikalije, čiji je Kow < 20 kao i lipofilne/visokosorptivne hemikalije čija Kow iznosi > 104.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXI** Csads(eq) = Kd x Cadads(eq)

*1.9. IZVOĐENJE METODE*

**1.9.1. Uslovi ispitivanja**

Ispitivanja se izvode na ambijentalnoj temperaturi, ako je moguće konstantnoj, u opsegu između 20° C i 25° C.

Uslovi pod kojima se centrifugira omogućavaju da se iz rastvora odstrane čestice veće od 0,2 μm. Ova donja granična vrednost izabrana je ciljano, jer odgovara prečniku najmanje čestice koja se smatra čvrstom i predstavlja granicu između čvrstih i koloidnih čestica. Smernice o tome kako odrediti uslove pod kojima će se centrifugirati dati su u Delu petom ove metode.

Ako raspoloživa oprema za centrifugiranje ne može garantovati odstranjivanje čestica većih od 0,2 μm, primenjuje se kombinacija centrifugiranja i filtracije. Da bi se izbegli gubici ispitivane supstance bilo koje vrste, ovi filtri su od prikladnog inertnog materijala. Potrebno je dokazati da u toku filtracije nije došlo ni do kakvih gubitaka ispitivane supstance.

**1.9.2. Etapa 1: preliminarna studija**

Cilj preliminarne studije već je naveden u odeljku 1.2. ove metode. Smernice o postavljanju ovakvog ispitivanja navedene su u ovoj metodi.

*1.9.2.1. Izbor optimalnih odnosa količina zemljišta i rastvora*

Koriste se dve vrste zemljišta i tri odnosa količina zemljišta i rastvora (šest eksperimenata). Jedna vrsta zemljišta ima visok sadržaj organskog ugljenika i nizak sadržaj ilovače, a druga nizak sadržaj organskog ugljenika i visok sadržaj ilovače. Sugeriše se upotreba sledećih odnosa:

- 50 g zemljišta i 50 cm3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/1),

- 10 g zemljišta i 50 cm3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/5),

- 2 g zemljišta i 50 cm3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/25).

Najmanja količina zemljišta na kojoj se eksperiment može izvesti zavisi od opremljenosti laboratorije i efikasnosti primenjenih analitičkih metoda. Da bi se ispitivanjem dobili pouzdani rezultati, preporučuje se upotreba 1 g, a ako je moguće i 2 g uzorka zemljišta.

Da bi se proverila stabilnost ispitivane supstance u rastvoru CaCl2 i moguća adsorpcija na površine posude za ispitivanje, jedan kontrolni uzorak, u kom se nalazi samo ispitivana supstanca u 0,01 M rastvoru CaCl2 (bez zemljišta) podvrgava se istim postupcima kao i ispitivani sistemi.

Istoj ispitivanoj proceduri podvrgava se i po jedna slepa proba za svaki uzorak zemljišta, koju čini ista količina zemljišta i 0,01 M rastvora CaCl2 (ali bez ispitivane supstance), ukupne zapremine od 50 cm3. Tokom analize, ovaj uzorak služi kao osnovna kontrola koja omogućava otkrivanje interferentnih supstanci, ili zagađenih zemljišta.

Sva ispitivanja, uključujući i ona koji se obavljaju na kontrolama i slepim probama, postaviti najmanje u duplikatu. Ukupan broj uzoraka koje je potrebno pripremiti za studiju može se izračunati prema metodologiji koja se primenjuje.

Metode koje se primenjuju u okviru preliminarne studije načelno su istovetne metodama koje se primenjuju u glavnoj studiji, a izuzeci od tog pravila su navedeni.

Uzorci zemljišta, vazdušno osušeni, uravnotežuju se tako što se dan pre početka ispitivanja, u toku noći (12 sati) protresu zajedno sa najmanje 45 cm3 0,01 M rastvora CaCl2. Potom se dodaje izvesna zapremina osnovnog rastvora, kako bi se dobila krajnja zapremina od 50 cm3. Ova zapremina dodatog osnovnog rastvora:

1. ne prelazi 10% krajnje zapremine tečne faze od 50 cm3, kako bi se priroda rastvora pre uravnoteženja što manje promenila i

2. ako je moguće potrebno je postići da prvobitna koncentracija ispitivane supstance koja se nalazi u dodiru sa zemljištem (C0) bude za najmanje dva reda veličine viša od granice detekcije upotrebljene analitičke metode.

Ovakav prag obezbeđuje tačna merenja čak i u slučajevima jake adsorpcije (> 90%), ali i naknadno određivanje adsorpcionih izotermi. Preporučuje se i da, ukoliko je izvodljivo, početna koncentracija ispitivane supstance (C0) ne pređe polovinu vrednosti njene granične rastvorljivosti.

U ovoj metodi dat je primer kako se izračunava koncentracija osnovnog rastvora (Cst). Granica detekcije od 0,01 μg/cm3 i adsorpcija od 90% se pretpostavljaju, pa početna koncentracija ispitivane supstance koja je u dodiru sa zemljištem iznosi 1 μg/cm3 (da za dva reda veličine prelazi granicu detekcije analitičke metode). Uz pretpostavku da je dodata najviša preporučena zapremina osnovnog rastvora, tj. 5 cm3 do 45 cm3 0,01 M uravnoteženog rastvora CaCl2 (= 10% osnovnog rastvora, dodate u vodenu fazu do ukupne zapremine od 50 cm3), koncentracija osnovnog rastvora iznosi 10 μg/cm3 jer tako prelazi granicu detekcije analitičke metode za tri reda veličine.

Vrednost pH tečne faze izmeriti pre i nakon dodira sa zemljištem, jer je pH vrednost značajna u celokupnom procesu adsorpcije, posebno supstanci podložnih jonizaciji.

Smeša se protrese dok se ne postigne adsorpciona ravnoteža. Vreme potrebno da se u zemljištima postigne ravnoteža izrazito je varijabilno i zavisi od hemikalije i zemljišta. Uglavnom je dovoljan period od 24 sata**77**. U okviru preliminarnog ispitivanja, uzorci se kroz period mešanja od 48 sati prikupljaju redno (npr. 4-ti, 8-mi, 24. i 48. sat). Vremenski raspored obavljanja analize razmotriti fleksibilno, poštujući radno vreme i radni raspored laboratorije.

Analiza ispitivane supstance u tečnoj fazi može se obaviti na dva moguća načina - paralelnom i rednom metodom. Paralelna metoda sa ispitivanog gledišta je dugotrajnija i zamornija, a matematička obrada dobijenih rezultata je jednostavnija (videti Deo šesti ove metode). Izbor metodologije koja se primenjuje prepušta se licu koje izvodi ispitivanje, a koje pri donošenju odluke uzima u obzir opremljenost dostupne laboratorije i resurse koji su joj stavljeni na raspolaganje.

1. Paralelna metoda - pripreme se uzorci međusobno istog količinskog odnosa zemljišta i rastvora, u broju koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima se želi proučiti kinetika adsorpcije. Nakon centrifugiranja i filtracije, tečna faza prve kivete iznova se prikuplja u meri u kojoj je to moguće i izmeri, npr. nakon 4 sata, tečna faza druge kivete nakon 8 sata, treće kivete nakon 24 sata, itd.

2. Redna metoda - za svaki količinski odnos zemljišta i rastvora pripremaju se najviše dva uzorka. U definisanim vremenskim razmacima, smeša se centrifugira da bi se faze razdvojile. Manji alikvot tečne faze odmah se analizira na prisustvo ispitivane supstance. Ispitivanje se nastavlja sa početnom smešom. Ako se nakon centrifugiranja primenjuje filtracija, laboratorija je adekvatno opremljena za postupak filtracije manjih tečnih alikvota. Da se odnos zemljišta i rastvora ne bi značajno promenio i da bi se u toku ispitivanja umanjila masa rastvorene supstance podložna adsorpciji, preporučuje se da zapremina uzetih alikvota ne prelazi 1% zapremine rastvora.

Procenat adsorpcije Ati u svakoj od vremenskih tačaka (ti) računa se na osnovu početne nominalne koncentracije i koncentracije izmerene u vreme uzimanja uzorka (ti), korigovane na vrednost slepe probe. Krive na kojima je Ati prikazan u funkciji vremena (videti Sliku 1 u Delu šestom ove metode) crtaju se da bi se utvrdilo vreme u kom je je postignut plato ravnotežnog stanja**XXII**. Uz to se računa i vrednost Kd u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja. Na osnovu te vrednosti se iz krive prikazane na Slici 1. izaberu adekvatni količinski odnosi zemljišta i rastvora sa ciljem da procenat adsorpcije pređe 20%, a ako je moguće dostigne > 50%**61**. Sve primenljive jednačine i sva načela koja važe za crtanje krivih, dati su u odeljku 2. ove metode, kao i u Delu šestom ove metode.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXII** Krive na kojima je koncentracija ispitivane supstance u vodenoj fazi Caqads prikazana u funkciji vremena, mogu biti korišćene i za procenu dostizanja ravnotežnog stanja (videti Sliku 2. u Delu šestom ove metode).

*1.9.2.2. Određivanje trenutka u kom je postignuto ravnotežno stanje adsorpcije i količina supstance koja se adsorbovala u trenutno postizanja ravnotežnog stanja*

Krive Ati ili Caqads u funkciji vremena omogućavaju utvrđivanje činjenice da je postignuto ravnotežno stanje adsorpcije, kao i količine ispitivane supstance koja se adsorbovala u trenutku postizanja ravnotežnog stanja. Primeri krivih prikazani su na Slikama 1. i 2. koje su date u Delu šestom ove metode.

Ako se pri eksperimentisanju sa određenom vrstom zemljišta ne dođe do platoa, već se beleži siguran porast adsorpcije, razlog mogu biti faktori koji situaciju čine složenom, a to su biorazgradljivost, odnosno spora difuzija. Činjenica da je došlo do biorazgradljivosti može se potvrditi ponavljanjem ispitivanja na sterilisanom uzorku zemljišta. Ako se ni u tom slučaju ne dostigne plato, lice koje izvodi ispitivanje traži druge pojave, potencijalno uključene u specifična istraživanja koja sprovodi. To se može uraditi određenim modifikacijama ispitivanih uslova (temperature, trajanja protresanja, količinskog odnosa zemljišta i rastvora). Licu koje izvodi ispitivanje prepušta se odluka hoće li nastaviti ispitivanje, uprkos mogućnosti da ne uspe da postigne ravnotežno stanje.

*1.9.2.3. Adsorpcija na površinu posude za ispitivanje i stabilnost ispitivane supstance*

Neki podaci o adsorpciji ispitivane supstance na površinu posude za ispitivanje, kao i o njenoj stabilnosti, mogu se dobiti analizom kontrolnih uzoraka. Ako se uoči osiromašenje sadržaja ispitivane supstance veće od standardne greške analitičke metode, moguće je da je to povezano sa abiotičkom razgradnjom, odnosno adsorpcijom na površinu posude za ispitivanje. Razlikovanje ove dve pojave postiže se temeljnim pranjem zidova posude poznatom zapreminom prikladnog rastvarača i analiziranjem rastvora za pranje na prisustvo ispitivane supstance. Ako se ne uoči da je na površini posude za ispitivanje došlo do adsorpcije, ovakvo osiromašenje ukazuje na abiotičku nestabilnost ispitivane supstance. Ako je došlo do adsorpcije, postojeće posude za ispitivanje je potrebno zameniti onima od drugačijeg materijala. Podaci o adsorpciji dobijeni ovim ispitivanjem ne mogu se sa sigurnošću ekstrapolirati na metodu koja se tiče količinskog odnosa zemljišta i rastvora. Na ovu adsorpciju utiče prisustvo zemljišta.

Dodatni podaci o stabilnosti ispitivane supstance mogu se dobiti određivanjem prvobitnog masenog balansa, praćenog u toku vremena. To znači da se tečna faza, ekstrakti zemljišta i zidovi posude za ispitivanje analiziraju na prisutnost ispitivane supstance. Razlika u masi dodate ispitivane hemikalije i zbira njenih hemijskih masa u tečnoj fazi, ekstraktima zemljišta i zidovima posude za ispitivanje, jednaka je razgrađenoj, odnosno uparenoj, odnosno neekstrahovanoj masi supstance. Da bi se odredio maseni balans u toku ispitivanja je potrebno postići ravnotežno stanje adsorpcije.

Maseni balans se određuje na zemljištima i za onaj količinski odnos zemljišta i rastvora koji u određenom tipu zemljišta dovodi do osiromašenja sadržaja ispitivane supstance za više od 20%, ako je moguće > 50% u ravnotežnom stanju. Kada se ispitivanje, usmereno na pronalaženje najpovoljnijeg količinskog odnosa zemljišta i rastvora koji je potrebno upotrebiti u glavnom ispitivanju, nakon 48 sati završi analizom poslednjeg uzorka tečne faze, faze se dele centrifugiranjem i po potrebi filtracijom. Tečna faza se ponovo sakuplja u meri u kojoj je to moguće, a zatim se zemljištu dodaje adekvatan ekstrakcioni rastvarač (koeficijenta ekstrakcije od najmanje 95%), kojim se iz tla ekstrahuje ispitivana supstanca. Preporučuju se najmanje dve uzastopne ekstrakcije. Zatim se odredi količina ispitivane supstance u ekstraktima dobijenim iz zemljišta i posuda za ispitivanje i izračuna maseni balans (jednačina 10 u odeljku 2. ove metode). Ako količina ispitivane supstance iznosi manje od 90%, smatra se da će ispitivana supstanca, u toku trajanja ispitivanja, biti nestabilna. Istraživanja mogu da se nastave vodeći računa o nestabilnosti ispitivane supstance u ovom slučaju se u okviru glavne studije preporučuje analiza obe faze.

*1.9.3. Etapa 2: kinetika adsorpcije pri jedinoj koncentraciji ispitivane supstance*

Koristi se pet tipova zemljišta, izabranih iz Tabele 1. Postoji prednost u uključivanju nekih ili svih vrsta zemljišta korišćenih u okviru preliminarne studije u ovih pet tipova. Zemljišta korišćena već u preliminarnoj studiji nije potrebno ponovo ispitivati u etapi 2.

Vreme potrebno da dođe do ravnotežnog stanja, količinski odnos zemljišta i rastvora, težina uzorka zemljišta, zapremina tečne faze koja je u dodiru sa zemljištem i koncentracija ispitivane supstance u rastvoru bira se na osnovu rezultata preliminarne studije. Analizu ako je moguće uraditi nakon 2, 4, 6 ili 8 sati (ako je moguće i nakon 10 sati), kao i nakon 24 sata kontakta ispitivane supstance i zemljišta. Ako rezultati ispitivanja usmerenog na pronalaženje pogodnog odnosa zemljišta i rastvora pokažu da je potrebno duže vreme da ispitivana hemikalija dostigne ravnotežno stanje, vreme protresanja se može produžiti na najviše 48 sati. Pri razmatranju i sastavljanju vremenskog rasporeda analiza, moguća je i određena fleksibilnost.

Da bi se omogućilo utvrđivanje varijanse rezultata, svaki eksperiment (jedan uzorak zemljišta i jedan rastvora) postavi se najmanje u duplikatu. U okviru svakog ispitivanja, analizira se i jedna slepa proba. Slepa proba se sastoji od zemljišta i 0,01 M rastvora CaCl2, bez ispitivane supstance, pri čemu su težina zemljišta i zapremina rastvora zastupljeni u njoj, identični onima upotrebljenim u ispitivanom uzorku. Kontrolni uzorak koji se sastoji isključivo od ispitivane supstance u 0,01 M rastvoru CaCl2 (bez zemljišta), podvrgava se identičnom postupku ispitivanja, čime se sprečavaju neočekivani obrti.

Procenat adsorpcije računa se za svaku od vremenskih tačaka Ati, odnosno vremenski interval AΔti (prema potrebi), a na krivoj se prikazuje u funkciji vremena. Računaju se i koeficijent raspodele (Kd) u ravnotežnom stanju, kao i (za nepolarne organske hemikalije) adsorpcioni koeficijent normalizovan na sadržaj organskog ugljenika (Koc).

Rezultati ispitivanja kinetike adsorpcije

Linearna Kd vrednost tačno opisuje sorpciono ponašanje u zemljištu**35,78** i predstavlja izraz inherentne pokretljivosti hemikalija u zemljištu. Na primer, hemikalije kod kojih je Kd ≤ 1cm3/g smatraju se kvalitativno pokretljivim. Na sličan način razvijena je šema klasifikacije pokretljivosti bazirana na Koc vrednostima**16**. Postoje i šeme klasifikacije u odnosu na proceđivanje kroz zemljište, bazirane na odnosu između Koc i DT50**32,79**.

Prema rezultatima studija u okviru kojih je analizirana greška**61**, Kd vrednosti niže od 0,3 cm3/g ne mogu se tačno utvrditi na osnovu opadanja koncentracije ispitivane supstance u tečnoj fazi, čak i kad se (što se tačnosti tiče) primeni najpogodniji količinski odnos zemljišta i rastvora, tj. 1:1. U ovom slučaju se preporučuje analiza obe faze: zemljišta i rastvora.

Studiju adsorpcionog ponašanja hemikalije u zemljištu i njene moguće pokretljivosti nastaviti određivanjem Frojndlihovih adsorpcionih izotermi za ove ispitivane sisteme, za koje je moguće tačno odrediti Kd, ako se sledi dosledno ispitivani protokol ove metode ispitivanja. Tačno određivanje istog moguće je ako vrednost koja se dobije množenjem Kd sa odnosom zemljišta i rastvora iznosi > 0,3 u slučaju kada su merenja zasnovana na opadanju koncentracije u tečnoj fazi (dakle na indirektnoj metodi) ili u slučaju kada se analiziraju obe faze (direktnom metodom)i kada vrednost iznosi > 0,1**61**.

**1.9.4. Etapa 3: Adsorpcione izoterme i kinetika desorpcije/desorpcijske izoterme**

*1.9.4.1. Adsorpcione izoterme*

Koristi se pet koncentracija ispitivane supstance, ako je moguće takvih da pokrivaju dva reda veličine. Pri izboru ovih koncentracija potrebno je voditi računa o rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi i njenim krajnjim koncentracijama koje se u tečnoj fazi beleže u trenutku postizanja ravnotežnog stanja. Količinski odnos zemljišta i rastvora za vreme celog trajanja studije održavati nepromenjenim. Ispitivanje adsorpcije obavlja se, kako je opisano, sa razlikom što se u vremenskom razdoblju potrebnom da se dostigne ravnotežno stanje, prethodno određeno u Etapi 2 ispitivanja, tečna faza analizira samo jednom. U rastvoru se određuju ravnotežne koncentracije, a količina adsorbovane supstance izračunava se iz osiromašenja sadržaja ispitivane supstance u rastvoru, tj. opadanja koncentracije ispitivane supstance u njoj, ili direktnom metodom. Adsorbovana masa ispitivane supstance po jedinici mase zemljišta grafički se prikazuje kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitivane supstance (videti odeljak 1.2. ove metode).

Rezultati ispitivanja kojim se određuju adsorpcione izoterme

Među do sada predloženim matematičkim modelima koji opisuju proces adsorpcije, najčešće se koristi Frojndlihova izoterma. Detalji u vezi tumačenja i značaja adsorpcionih modela mogu se naći u litetaturi**41,45,80,81,82**.

Napomena: poređenje vrednosti Kf (Frojndlihov adsorpciona konstanta) različitih supstanci moguće je samo ako su izražene u istim jedinicama mere**83**.

*1.9.4.2. Kinetika desorpcije*

Cilj ove metode ispitivanja jeste da se istraži da li se hemikalija reverzibilno ili ireverzibilno adsorbuje na čestice zemljišta. Ovo je važan podatak, jer je proces desorpcije značajan za ponašanje hemikalije u prirodnom zemljištu. Ako se unesu u bazu podataka, podaci o desorpciji korisni su pri kompjuterskom modelovanju u okviru simulacije proceđivanja rastvorene hemikalije iz zemljišta. Ako se želi izvesti studija desorpcije, preporučuje se da se studija data u ovoj metodi sprovede na svakom sistemu za koji se u prethodnom ispitivanju kinetike adsorpcije moglo tačno odrediti Kd.

Slično kao i u studiji o kinetici adsorpcije, ispitivanje kinetike desorpcije moguće je izvesti na dva načina - paralelnom i rednom metodom. Izbor metodologije koja ća se primeniti u toku studije, prepušta se licu koje izvodi ispitivanja, koje će pri donošenju odluke voditi računa o opremljenosti dostupne laboratorije i sredstvima koja su na raspolaganju.

1. Paralelna metoda - za svaku vrstu zemljišta koja je izabrana za studiju desorpcije, pripremaju se uzorci identičnog količinskog odnosa zemljišta i rastvora i to u broju koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima se proučava kinetika desorpcije. Taj broj intervala je identičan broju upotrebljenom u studiji u kojoj se izučavala kinetika adsorpcije. Da bi se sistemu omogućilo da dostigne tačku ravnotežnog stanja desorpcije, ukupno trajanje ispitivanja može se i produžiti na primeren način. U svakom ispitivanju (jedan uzorak zemljišta, jedan rastvora) postavlja se i jedna slepa proba. Slepa proba se sastoji od zemljišta i 0,01 M rastvora CaCl2 u kome nema ispitivane supstance, pri čemu su težina zemljišta i zapremina rastvora identični onima u ispitivanom uzorku. Za kontrolni uzorak ispitivana supstanca se u 0,01 M rastvoru CaCl2 (bez zemljišta) ispituje po istom postupku. Sve smeše zemljišta i rastvora protresaju se dovoljno dugo dok se ne dostigne ravnotežno stanje adsorpcije (kako je to ranije utvrđeno u Etapi 2). Faze se potom dele centrifugiranjem, a tečne faze se uklanjaju koliko je moguće. Uklonjena zapremina rastvora nadomešta se jednakom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 u kome nema ispitivane supstance, a nove smeše ponovo se protresaju. Tečna faza iz prve kivete iznova se prikuplja u najvećoj mogućoj meri i potom izmeri nakon 2 sata, tečna faza iz druge kivete nakon 4 sata, tečna faza iz treće kivete nakon 6 sati, dok se ne dostigne ravnotežno stanje desorpcije.

2. Redna metoda - po završetku studije kojom se izučavala kinetika adsorpcije, smeša se centrifugira, a tečna faza uklanja koliko je moguće. Uklonjena zapremina rastvora nadomešta se sa 0,01 M rastvora CaCl2, bez ispitivane supstance. Nova smeša se protresa dok se ne dostigne ravnotežno stanje desorpcije. Za to vreme se smeša u definisanim vremenskim intervalima ponovo centrifugira, da se razdvoje faze. Manji alikvot tečne faze potom se analizira na prisustvo ispitivane supstance. Ispitivanje se dalje nastavlja sa izvornom smešom. Zapremina svakog pojedinog alikvota iznosi manje od 1% ukupne zapremine. Da bi se količinski odnos zemljišta i rastvora održao nepromenjenim, smesi se dodaje stalno ista količina svežeg 0,01 M rastvora CaCl2 i nastavlja se protresanje dok ne nastupi drugi vremenski interval.

Procenat desorpcije, prema potrebama studije, računa se za svaku vremensku tačku (Dti), odnosno vremenski interval (DΔti), a na krivoj se prikazuje u funkciji vremena. Računa se i koeficijent desorpcije Kd u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja. Sve jednačine, primenljive u ovu svrhu, navedene su u odeljku 2. ove metode kao i u Delu šestom ove metode.

Rezultati ispitivanja kojim se izučava kinetika desorpcije

Uobičajene krive koje prikazuju procenat desorpcije Dti i procenat adsorpcije Ati u funkciji vremena, omogućavaju utvrđivanje reverzibilnosti procesa adsorpcije. Ako se dostigne ravnotežno stanje desorpcije za vreme čak dvostruko duže od onoga koje je bilo potrebno da se dostigne ravnotežno stanje adsorpcije, a ukupna desorpcija prelazi 75% ukupno adsorbovane količine ispitivane supstance, adsorpcija se smatra reverzibilnom.

*1.9.4.3. Desorpcione izoterme*

Frojndlihove desorpcione izoterme određuju se na istim tipovima zemljišta na kojima su se ispitivanjem određivale i adsorpcione izoterme. Ispitivanje desorpcije sprovodi se na način opisan u odeljku 1.9.4.2. ove metode, sa jedinom razlikom što se tečna faza analizira samo jedanput, u trenutku kada se dostigne ravnotežno stanje desorpcije. Izračunava se količina desorbovane ispitivane supstance. Sadržaj ispitivane supstance koji je u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište, grafički se prikazuje kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitivane supstance u rastvoru (videti odeljak 2. ove metode i Deo šesti ove metode).

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

Podaci dobijeni analizom prikazuju se u obliku tabela (videti Deo sedmi ove metode). Navode se rezultati pojedinačnih merenja i izračunate prosečne vrednosti. Prilažu se grafički prikazi adsorpcionih izotermi. Izračunavanja se vrše na način opisan u ovoj metodi.

Za potrebe ove metode, uzima se da težina 1 cm3 vodenog rastvora iznosi 1 g. Količinski odnos zemljišta i rastvora može se prikazati u jedinicama težinskog odnosa, ili odnosa težine i zapremine istim grafikonom.

*2.1. ADSORPCIJA*

Adsorpcija (u daljem tekstu: Ati) jeste procenat supstance adsorbovane na čestice zemljišta, u odnosu na količinu koja je u datim ispitivanim uslovima postojala na početku ispitivanja. Ukoliko je ispitivana supstanca postojana i ne adsorbuje se u značajnoj meri na zidove posude, Ati se računa za svaku vremensku tačku ti prema formuli:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ati = | msads(ti) | x 100 % | 3 |
| m0 |

pri čemu:

Ati jeste procenat adsorpcije u tački vremena ti (%);

msads (ti) jeste masa (μg) ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenu ti;

m0 jeste masa (μg) ispitivane supstance u ispitivanoj posudi na početku ispitivanja.

Izračunavanje procenta adsorpcije Ati u okolnostima kada se primenjuje paralelna, odnosno redna metoda, dato je u Delu šestom ove metode.

Koeficijent raspodele (Kd) jeste odnos između sadržaja supstance u čvrstoj fazi i njene masene koncentracije u tečnoj fazi, zabeležen u trenutku u kom je, u datim ispitivanim uslovima, dostignuta tačka ravnotežnog stanja adsorpcije.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kd = | Csads(eq) | = | msads(eq) | x | V0 | cm3/g | 4 |
| Caqads(eq) | maqads(eq) | m zemljišta |

pri čemu:

Csads jeste sadržaj (mg/g) supstance adsorbovane na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije;

Caqads jeste masena koncentracija(mg/cm3) supstance u tečnoj fazi u satu dostizanja ravotežnog stanja adsorpcije. Ova koncentracija određena je analitički, uzimajući u obzir vrednosti zabeležene analizom slepih proba;

maqads jeste masa supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije (mg);

jeste masa supstance u rastvoru u trenutku postizanja ravnotežnog stanja adsorpcije (mg);

mzemljišta jeste količina (g) čvrste faze, iskazana kao suva masa zemljišta;

V0 jeste početna zapremina (cm3) tečne faze koja se nalazi u dodiru sa zemljištem.

Odnos između Aeq i Kddat je formulom:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kd = | Aeq | x | V0 | cm3/g | 5 |
| 100 - Aeq | m zemljišta |

pri čemu:

Aeq jeste procenat (%) adsorpcije u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja.

Koeficijent adsorpcije normalizovan na sadržaj organskog ugljenika Koc povezuje koeficijent raspodele Kd sa sadržajem organskog ugljenika u uzorku zemljišta:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Koc = Kd x | 100 | cm3/g | 6 |
| %OC |

pri čemu:

% OC jeste procenat organskog ugljenika u uzorku zemljišta (g/g).

Koeficijent Koc jeste apsolutni broj koji bliže opisuje raspodelu, naročito nepolarnih organskih hemikalija, između organskog ugljenika u zemljištu ili sedimenta i vode. Adsorpcija ovih hemikalija korelira se sa sadržajem organskog ugljenika u čvrstom sorbensu**7**. Vrednosti Koc zavise od specifičnih parametara zemljišnih frakcija, koje se, zbog razlika u poreklu, načinu nastanka, itd. značajno razlikuju po svom sorptivnom kapacitetu.

*2.1.1. Adsorpcione izoterme*

Jednačina Frojndlihovih adsorpcionih izotermi povezuje količinu adsorbovane ispitivane supstance sa njenom koncentracijom u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja (jednačina [8]).

Podaci se obrađuju u odeljku 2.1. ove metode, a za svaku od ispitivanih posuda izračuna se sadržaj ispitivane supstance koja se adsorbovala na zemljište po završetku studije adsorpcije Csads (eq), na drugim mestima oznaka x/m. Smatra se da je ravnotežno stanje postignuto i da Csads (eq) predstavlja ravnotežnu vrednost:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Csads(eq) | msads(eq) | = | [C0- Caqads(eq) ] | xV0 | [g/g] | 7 |
| mzemljišta | mzemljišta |

Frojndlihova jednačina adsorpcije data je u jednačini [8]:

Csads(eq) = Ksads x Caqads (eq)1/n [g/g] 8

ili u linearnom obliku:

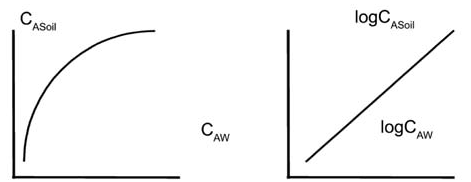
log Csads(eq) = log KFads + 1/n x log Caqads(eq) 9

pri čemu:

KFads jeste Frojndlihova konstanta adsorpcije; njegova dimenzija je cm3/g samo ako je 1/n = 1; u svim drugim slučajevima nagib 1/n uvodi u dimenziju KFads (μg1-1/n (cm3)1/n g-1);

n jeste konstanta regresije; 1/n je uglavnom unutar opsega 0,7 do 1,0 i sugeriše da su podaci o adsorpciji često blago nelinearni.

Jednačine [8] i [9] grafički se prikazuju, a vrednosti KFads i 1/n računaju se pomoću regresione analize, upotrebom jednačine [9]. Računa se i koeficijent korelacije logaritamske jednačine r2. Primer takvih krivih dat je na slici 2.



*2.1.2. Maseni balans*

Maseni balans (mass balance, u daljem tekstu: MB) jeste procenat supstance koji se može analitički detektovati, a ostaje nakon ispitivanja adsorpcije, u odnosu na nominalnu količinu supstance na početku ispitivanja.

Ako se rastvarač može u potpunosti pomešati sa vodom, obrada podataka je drugačija. Ako se rastvarač meša u potpunosti sa vodom, u cilju određivanja količine supstance koja se naknadno može ekstrahovati rastvaračem može se primeniti način obrade podataka iz odeljka 2.2. ove metode. Ako se rastvarač ne meša potpuno sa vodom, potrebno je odrediti količinu supstance koja se naknadno može detektovati.

MB se pri adsorpciji računa na sledeći način - podrazumeva se da naziv (mE) odgovara zbiru masa ispitivane hemikalije, ekstrahovane iz zemljišta i sa površine posude za ispitivanje pomoću organskog rastvarača:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| MB = | (Vrec x Caqads(eq) + mE)x100 | % | 10 |
| V0 x C0 |

pri čemu:

MB jeste maseni balans (%);

mE jeste ukupna masa (mg) ispitivane supstance ekstrahovana iz zemljišta i sa zidova posude za ispitivanje u dva koraka;

C0 jeste početna masena koncentracija ispitivane supstance koja se nalazi u dodiru sa zemljištem (mg/cm3);

Vrec jeste zapremina (cm-3) supernatanta nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije.

*2.2. DESORPCIJA*

Desorpcija (u daljem tekstu: D) jeste procenat ispitivane supstance koji se desorbovao, u odnosu na količinu supstance koja se, u datim ispitivanim uslovima, ranije adsorbovala:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dti = | maqdes(ti) | x100% | 11 |
| msads(eq) |

pri čemu:

Dti jeste procenat desorpcije u tački vremena ti (%);

maqdes (ti) jeste masa (μg) ispitivane supstance desorbovana iz zemljišta u tački vremena ti;

maqads (eq) jeste masa (μg) ispitivane supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije.

Način izračunavanja postotka desorpcije Dti, ako se koriste paralelno, odnosno redna metoda, dati su u Delu šestom ove metode.

U datim ispitivanim uslovima vidljivi koeficijent desorpcije (Kdes) jeste odnos sadržaja supstance koji je ostao u čvrstoj fazi i masene koncentracije desorbovane supstance u vodenom rastvoru, u trenutku kada se dostigne ravnotežno stanje desorpcije:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kdes = | msads(eq) - maqdes(eq) x VT | cm3/g | 12 |
| maqdes(eq) |

pri čemu:

Kdes jeste koeficijent desorpcije (cm3/g);

maqdes (eq) jeste ukupna masa (μg) ispitivane supstance desorbovana iz zemljišta u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije;

VT jeste ukupna zapremina tečne faze koji se u toku ispitivanja kinetike desorpcije nalazi u dodiru sa zemljištem (cm3).

Smernice za izračunavanje maqdes (aq) date su u odeljku 2.2. i u Delu šestom ove metode.

Napomena: Ukoliko je ispitivanje adsorpcije koje prethodi ovom ispitivanju izvedeno paralelnom metodom, smatra se da je zapremina VT u jednačini [12] jednaka V0.

*2.2.1. Desorpcione izoterme*

Frojndlihova jednačina desorpcionih izotermi stavlja sadržaj ispitivane supstance koji je ostao adsorbovan na zemljište u odnos sa koncentracijom ispitivane supstance u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije (jednačina [16]).

Za svaku od kiveta u kojima se nalazi ispitivani uzorak, sadržaj supstance koji je u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište računa se na sledeći način:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Csdes(eq) = | msads(eq) - maqdes(eq) | g/g | 13 |
| mzemljišta |

maqdes(eq) se definiše kao:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| maqdes(eq) = mmdes(eq) x | V0 | - maqAg | 14 |
| VrF |

pri čemu:

Csdes (eq) jeste sadržaj (μg/g) ispitivane supstance koji je u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište;

mmdes (eq) jeste masa (μg) supstance, određena u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije analitičkim putem;

maqA jeste masa (μg) ispitivane supstance koja je zbog nepotpune zamene zapremine ostala nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije;

maqdes (eq) jeste masa (μg) supstance u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije;

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| maqA = | maqads(eq) x | ( | V0 - VR | ) | 15 |
| V0 |

VrF jeste zapremina rastvora uzeta iz posude za ispitivanje u cilju merenja u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije (cm3);

VR jeste zapremina supernatanta odstranjenog iz posude za ispitivanje nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 (cm3).

Frojndlihova jednačina desorpcije:

Csdes(eq) = KFdes x Caqdes(eq)1/ng/g 16

ili u linearnom obliku

log Csdcs(eq) = log KFdes + 1/n x log Caqdes(eq) 17

pri čemu:

KFdes jeste Frojndlihova konstanta desorpcije;

*n* jeste konstanta regresije;

maqdes (eq) jeste masena koncentracija (mg/cm3) supstance u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije.

Jednačine [16] i [17] mogu se prikazati grafički, a vrednosti K i 1/n se računaju regresionom analizom, korišćenjem jednačine [17].

Napomena: Ukoliko Frojndlihov eksponent adsorpcije, odnosno desorpcije, 1/n, iznosi 1, Frojndlihova adsorpciona, odnosno desorpciona konstanta vezivanja (KFads, odnosno KFdes) biće jednaka konstantama ravnoteže adsorpcije, odnosno desorpcije (Kd, odnosno Kdes), a krive Cs u odnosu na Caq biće linearne. Ako ovi eksponenti ne iznose 1, krive Cs u odnosu na Caq neće biti linearne, a konstante adsorpcije, odnosno desorpcije variraće duž izotermi.

*2.2.2. Izveštaj*

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju upotrebljenih uzoraka zemljišta, uključujući:

- geografske odrednice lokacije (geografsku širinu i dužinu),

- datum uzimanja uzoraka,

- upotrebljenu vrstu zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma, itd.),

- dubinu sa koje je uzet uzorak,

- sadržaj peska/mulja/ilovače,

- pH vrednost (u 0,01 M rastvoru CaCl2),

- sadržaj organskog ugljenika,

- sadržaj organske materije,

- sadržaj azota,

- količinski odnos ugljenika i azota (C/N),

- kapacitet katjonske izmene (mmol/kg);

- sve podatke koji se odnose na prikupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta;

2) sve podatke relevantne za tumačenje adsorpcije/desorpcije ispitivane supstance:

- literaturu u kojoj se navode metode upotrebljene za određivanje svakog od pokazatelja,

- podatke o ispitivanoj supstanci na za to primeren način,

- temperaturu pri kojoj se ispitivanje odvijalo,

- uslove pod kojima su uzorci centrifugirani,

- analitički postupak upotrebljen za analizu ispitivane supstance,

- obrazloženje u kom se argumentuju razlozi zbog kojih je pri pripremi osnovnog rastvora ispitivane supstance upotrebljeno sredstvo koje olakšava rastvaranje i

- ukoliko je to relevantno, pojašnjenja korekcija kalkulacija;

3) podatke u skladu sa obrascem (datim u Delusedmom ove metode) i grafičke prikaze;

4) sve podatke i zapažanja koji doprinose tumačenju rezultata ispitivanja.

**3. LITERATURA**

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987) Investigations on the Adsorption and Desorption of SelectedChemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBAReport 106 02 045, Part I.

3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation.Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECDWorkshop on Selection of Soils/Sediments,Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry:Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on DataReporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS HarmonizedTest Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for anOrganic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides inCanada, 15 July 1987.

9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide.Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration ofpesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11. BBA (1990) Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centrefor Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R., (1989) 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticidesin soils', in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris,(Review).

13. Calvet R., (1980) 'Adsorption-Desorption Phenomena' in Interactions between herbicides and the soil.(R.J. Hance ed.), Academic Press, London, p. 83-122.

14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), 'The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication No 22, p. 31-44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974) 'An evaluation of kinetic and equilibriume quations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol.38(1), p. 29-35.

16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981) 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis', in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, WashingtonDC.

17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965) 'Movement and sorption of chemicals applied tothe soil'. Weeds, 13, p. 185-190.

18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption ofagrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, p. 524-528.

19. Russell M.H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988) 'Recommendedapproach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticides(24). Pure Appl. Chem., 60, p. 901-932.

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976) 'Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils'. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 137-157, BCPC,Surrey, UK.

22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967) 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Food Agric., 18, p.269-273.

23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981) 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazineherbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, p. 45-52.

24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977) 'Effect of adsorption, movement and persistence on thebiological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.

25. Osgerby J.M., (1973) 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, p. 247-258.

26. Guth J.A., (1972) 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Bcden'. Schr.Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 143-154.

27. Hamaker J.W., (1975) 'The interpretation of soil leaching experiments', in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), p. 135-172, Plenum Press, NY.

28. Helling C.S., (1971) 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, p. 732-210.

29. Hamaker J.W., (1972) 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I.Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, p. 49-143.

30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981) 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison ofcalculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, p. 37-44.

31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984) 'Potential pesticide contamination ofgroundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, AcsSymp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D.I., (1989) 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'.J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.

33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976) 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement insoils'. J. of Soil Sci., 28, p. 340-350.

34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980) 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydationproducts in fallow soils'. Pest. Sci., 11, p. 389-395.

35. Green R.E., and Karickoff S.W., (1990) 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the SoilEnvironment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series No 2, p.80-101,

36. Lambert S.M., (1967) 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri.Food Chem., 15, p. 572-576.

37. Hance R.J., (1969) 'An empirical relationship between chemical structure and the sorption of someherbicides by soils'. J. Agri. Food Chem., 17, p. 667-668.

38. Briggs G.G. (1969) 'Molecular structure of herbicides and their sorption by soils'. Nature, 223, p. 1288.

39. Briggs G.G. (1981) 'Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-waterpartition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem.,29, p. 1050-1059.

40. Sabljic A., (1984) 'Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance bymolecular topology'. J. Agric. Food Chem., 32, p. 243-246.

41. Bailey G.W., and White J.L., (1970) 'Factors influencing the adsorption, desorption, and movement ofpesticides in soil'. Residue Rev., 32, p. 29-92.

42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968) 'Adsorption of organic herbicides by montomorillonite:Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, p. 222-234.

43. Karickhoff S.W., (1981) 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on naturalsediments and soils'. Chemosphere 10, p. 833-846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989) 'Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners'.Environ. Toxicol. Safety 21, p. 1-17.

45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972) 'Adsorption in organic chemicals' in Organic Chemicals in theSoil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY,1972, p. 49-143.

46. Deli J., and Warren G.F., 1971 'Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils'. Weed Sci.19, p. 67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975) 'Napropamide Adsorption,desorption and Movement in soils'. Weed Science, Vol. 23, p. 454-457.

48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) 'Adsorption of s-triazine herbicides by soil organicpreparations' in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic EnergyAgency, Vienna.

49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980) 'Methods for distributing pesticide loss in field run-off betweenthe solution and adsorbed phase', CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosionfrom Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDAConservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physicalmethods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51. Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982) 11th edition.

52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. 'Methods of Soil Analysis', Vol 1 and 2,American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques.

55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality - Sampling - Part 3: Guidance on safety of sampling.

56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality - Sampling - Part 4: Guidance on the investigation of natural andcultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality - Sampling - Part 5: Guidance on the investigation of soilcontamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling andstorage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) 'Precision in pesticide adsorption measurements'. Soil Sci. Am.Proc., 34, 353-354.

60. Grover R., and Hance R.J. (1970) 'Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine'.Soil Sci., p. 109-138.

61. Boesten, J.J.T.I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients inpesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, p. 31-41.

62. Boesten, J.J.T.I. 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relationto OECD guideline 106' Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour ofpesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980) 'Comportement de substances herbicides dans le sol enfonction de leur structure chimique'. Weed Res. 21, p. 227-231.

64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981) 'Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments'. J. Environ.Qual., 10(3), p. 382-386.

65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983) 'Partition equilibria of non-ionic organiccompounds between soil organic matter and water'. Environ. Sci. Technol., 17(4), p. 227-231.

66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984) 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm.Sci. Health, B19 (3), p. 297-312.

67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retentionfactors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), p. 109-116.

68. Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990) Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, WashingtonDC.

69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980) 'Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota' in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), p.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979) 'A physical concept of soil-water equilibria for non-ionicorganic compounds'. Science, Vol. 206, p. 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981) 'Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption'. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, p. 38-42.

72. Karickhoff S.W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere, Vol. 10(8), p. 833-846.

73. Moreale A., van Bladel R., (1981) 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relationsolubilité - reactivité. Revue de l'Agric., 34 (4), p. 319-322.

74. Müller M., Kördel W. (1996) 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil'. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995) 'HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test'. Chemosphere 30 (7), p. 1373-1384.

76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC - screening method for the determination of theadsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), p.2341-2352.

77. Hance, R.J., (1967), 'The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides'. Weed Research, Vol. 7, p. 29-36.

78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), 'The retention processes: mechanisms' in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No 2,Madison, Wisconsin.

79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), 'Potential pesticide contamination of ground water from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, ACSSymp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C.H., (1970) 'Interpretation and use of sorption isotherms' in Sorption and Transport Processes inSoils. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.

81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960) 'Studies in adsorption: XI. A system ofclassification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms andin measurements of pesticides surface areas of soils'. J. Chem. Soc., p. 3973-93.

82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980) 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3.Caractéristiques générales de l'adsorption'. Ann. Agron. 31, p. 239-251.

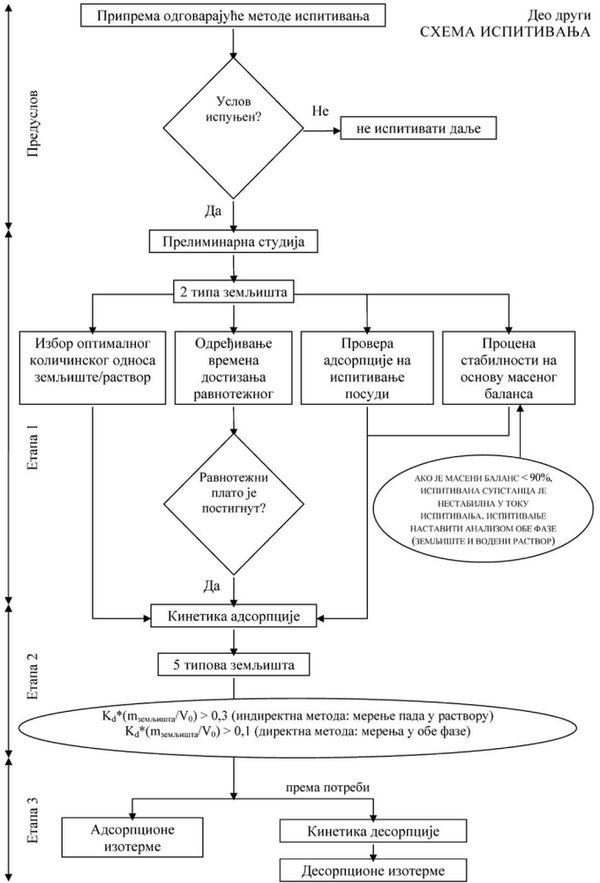
83. Bedbur E., (1996) 'Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil andthe environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

84. Guth, J.A., (1985) 'Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Propertiesand their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc.Amer. Proc. 26, p. 305 (1962).

**Deo drugi**

**SHEMA ISPITIVANJA**



**Deo treći**

**UTICAJ PRECIZNOSTI ANALITIČKE METODE I PROMENA KONCENTRACIJE NA PRECIZNOST REZULTATA ADSORBCIJE**

Iz sledeće tabele**84** jasno je da kada je razlika između početne mase (m0 = 110 μg) i mase u ravnotežnom stanju (maqads (eq) = 100 μg) ispitivane supstance u rastvoru veoma mala, greška od 5% kod merenja koncentracije pri ravnotežnom stanju rezultira greškom od 50%kod izračunavanja mase supstance adsorbovane na zemljištu (maqads (eq)) i 52,4% kod izračunavanja Kd.

Količina zemljišta mzemljišta = 10 g

Zapremina rastvora V0 = 100 cm3

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | maqads (eq) (mg) | Caqads (eq) (mg/cm3) | R | maqads (eq)**XXI** (mg) | Caqads (eq)**XXI** (mg/cm3) | R**XXI** | Kd**XXIII** | R' |
| za A = 9% | | | | | | | | |
| m0 = 110 g  ili C0 = 1,100 g/ cm3 | 100 | 1,000 | prava vrednost | 10 | 1,00 | prava vrednost | 1 |  |
| 101 | 1,010 | 1% | 9 | 0,90 | 10% | 0,981 | 10,9% |
| 105 | 1,050 | 5% | 5 | 0,50 | 50% | 0,476 | 52,4% |
| 109 | 1,090 | 9% | 1 | 0,10 | 90% | 0,092 | 90,8% |
| za A = 55% | | | | | | | | |
| m0 = 110 g  ili C0 = 1,100 g/ cm3 | 50,0 | 0,500 | prava vrednost | 60,0 | 6,00 | prava vrednost | 12,00 |  |
| 50,5 | 0,505 | 1% | 59,5 | 5,95 | 0,8% | 11,78% | 1,8% |
| 52,5 | 0,525 | 5% | 57,5 | 5,75 | 4,0% | 10,95 | 8,8% |
| 55,0 | 0,550 | 10% | 55,0 | 5,50 | 8,3% | 10,00 | 16,7% |
| za A = 99% | | | | | | | | |
| m0 = 110 g  ili C0 = 1,100 g/ cm3 | 1,100 | 0,011 | prava vrednost | 108,9 | 10.89 | prava vrednost | 990 |  |
| 1,111 | 0,01111 | 1% | 108,889 | 10,8889 | 0,01% | 980 | 1,0% |
| 1,155 | 0,01155 | 5% | 108,845 | 10,8845 | 0,05% | 942 | 4,8% |
| 1,21 | 0,0121 | 10% | 108,790 | 10,8790 | 0,10% | 899 | 9,2% |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **XXIII** msads = m0 - maqads (eq), Csads (eq) = |  | C0 - Csads (eq) |  | x V0 | x Kd = | msads(eq) | x | V0 |  |
|  | mzemljišta |  |  | maqads (cd) | mzemljišta |  |

Pri čemu:

msads (eq) jeste masa ispitivane supstance u zemljišnoj fazi u ravnotežnom stanju μg;

maqads (eq) jeste masa ispitivane supstance u tečnoj fazi u ravnotežnom stanju μg;

Csads (eq) jeste sadržaj ispitivane supstance u zemljišnoj fazi u ravnotežnom stanju μg/g;

Caqads (eq) jeste masena koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi u ravnotežnom stanju μg/cm3;

R jeste analitička greška kod određivanja maqads (eq);

R′ jeste izračunata greška zbog analitičke greške R.

**Deo četvrti**

**TEHNIKE PROCENE Kd**

Tehnike utvrđivanja omogućavaju predviđanje Kd bazirano na korelacijama sa npr. vrednostima Kow**12,39,63-68,** podacima o rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi**12,19,21,39,68-73**, odnosno podacima o polaritetu, izvedenim iz podataka dobijenih analizom reverzne faze pomoću HPLC**74-76**. Kako je prikazano u Tabelama 1. i 2, iz ovih jednačina se izračunava Koc ili Kom, a potom, indirektno, Kd iz jednačina:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Koc = | Kd x | 100 | cm3/g] | Kom = | Kd | x | 100 | cm3/g |
| %OC | 1.724 | %OC |

Koncept ovih korelacija se bazira na dve pretpostavke:

1. organska materija u zemljištu dominantno kontroliše adsorbciju supstance i

2. interakcije su uglavnom nepolarne.

Kao rezultat ove korelacije:

1. nisu ili su samo u manjoj meri primenljive na polarne supstance i

2. nisu primenljive u slučajevima kada je sadržaj organske materije u zemljištu veoma nizak**12**.

Zadovoljavajuće korelacije pronađene su između Pow i adsorbcije**19**, ali isto se ne može tvrditi za odnos između rastvorljivosti u vodi i adsorbcije**19,21**. Studije su kontradiktorne.

Primeri korelacija između koeficijenta adsorbcije i koeficijenta raspodele u sistemu n-oktanol/voda, kao i rastvorljivosti u vodi dati su u Tabelama 1 i 2.

Tabela 1: Primeri korelacije između koeficijenta distribucije adsorbcije i koeficijenta raspodele u sistemu   
*n*-oktanol/voda (ostali primeri dati su u literaturi**12,68**)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Supstanca | Korelacija | Autori |
| Supstituisane uree | log Kom = 0,69 + 0,52 log Pow | Briggs (1981)**39** |
| Aromatična hlorovane supstance | log Koc = -0,779 + 0,904 log Pow | Chiou et al. (1983)**65** |
| Različiti pesticidi | log Kom = 4,4 + 0,72 log Pow | Gerstl i Mingelgrin (1984)**66** |
| Aromatični ugljovodonici | log Koc = - 2,53 + 1,15 log Pow | Vowles i Mantoura (1987)**67** |

Tabela 2: Primeri korelacije između koeficijenta distribucije adsorbcije i rastvorljivosti u vodi (ostali primeri dati su u literaturi)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Supstanca | Korelacija | Autori |
| Različiti pesticidi | log Kom = 3,8 - 0,561 log Sw | Gerstl i Mingelgrin (1984)**66** |
| Alifatične, aromatične hlorovane supstance | log Kom = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) log Sw | Chiou et al. (1979)**70** |
| α-naftol | log Koc = 4,273 - 0,686 log Sw | Hasset et al. (1981)**71** |
| Ciklične, aromatične, alifatične supstance | log Koc = - 1,405 - 0,921 log Sw - 0,00953 (mp - 25) | Karickhoff (1981)**72** |
| Različita jedinjenja | log Kom = 2,75 - 0,45 log Sw | Moreale van Blade (1982)**73** |

**Deo peti**

**IZRAČUNAVANJA ZA DEFINISANJE USLOVA CENTRIFUGIRANJA**

1. Trajanje centrifugiranja dato je sledećom formulom, uz pretpostavku o sfernim česticama:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| t = |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s157.gif |  | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s156.gif | 1n |  |  |  |
| 9 |  | Rb |  | [1] |
| 2 | 2rp2 (s - aq) | Rt |
|  |  |  |

pri čemu:

ω jeste rotaciona brzina (= 2 *π* rpm/60), (rad/s);

rpm jesu obrtaji u minuti;

η jeste viskozitet rastvora, (g/s cm-1);

rp jeste prečnik čestice, (cm);

ρs jeste gustina zemljišta, (g/cm3);

ρaq jeste gustina rastvora, (g/cm3);

Rt jeste udaljenost od centra rotora centrifuge do vrha rastvora u kiveti, (cm);

Rb jeste udaljenost od centra rotora centrifuge do dna rastvora u kiveti, (cm);

Rb - Rt jeste visina stuba smeše zemljište/rastvor u kiveti, (cm).

Zbog pojednostavljenja parametri su opisani u jedinicama koje nisu SI jedinice (g, cm).

Opšteprihvaćeno je da se izračunato vreme duplira da bi se obezbedilo kompletno razdvajanje.

2. Jednačina [1] može se pojednostaviti ako se uzme u obzir da su viskozitet (η) i gustina (ρaq) rastvora jednake viskozitetu i gustini vode na 25°C; sledi η = 8,95 Í 10-3 g/scm-1 i ρaq = 1,0 g/cm3.

Vreme cetrifugiranja je:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| t = | 3,7 | 1n | Rb |  | |
| (rpm)2 x rp2 (ρs -1) | Rt | 2 |  |

3. Iz jednačine [2] postaje jasno da su za definisanje uslova centrifugiranja, tj. njenog trajanja (t) i brzine (rpm), potrebnih za razdvajanje čestica specifične veličine (u našem slučaju prečnika 0,1 μm), važna dva parametra:

- gustina zemljišta i

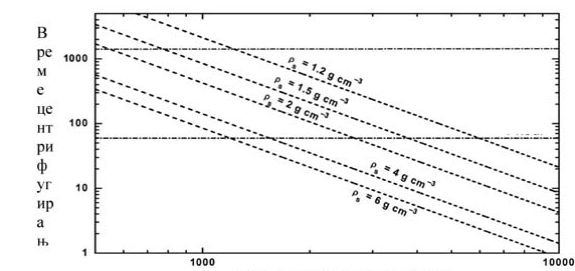
- visina stuba smeše u kiveti za centrifugiranje (Rb - Rt), tj. udaljenost od vrha nivoa rastvora do dna kivete na kojoj se čestica proteže; ako je zapremina fiksna, visina stuba smeše u kiveti će očigledno zavisiti od kvadrata njenog prečnika.

Slika 1 prikazuje varijacije u dužini trajanja centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifugiranja (rpm), pri različitim gustinama zemljišta (ρs) (Slika 1a) i različitim visinama stuba smeše u kivetama za centrifugiranje (Slika 1b). Iz Slike 1a sledi da je uticaj gustine zemljišta očigledan. Na primer, pri klasičnom centrifugiranju uzorka zemljišta gustine 1,2 g cm3, brzinom od 3.000 obrtaja u minuti, centrifugiranje traje približno 240 minuta, dok centrifugiranje zemljišta gustine 2,0 g cm3 traje svega 50 minuta. Na sličan način, iz Slike 1b sledi da ako visina stuba smeše u kiveti iznosi 10 cm, klasično centrifugiranje brzinom od 3.000 obrtaja u minuti traje približno 50 minuta, a ako ta visina iznosi 1 cm, samo 7 minuta. Važno je naći optimalan odnos između centrifugiranja koje iziskuje najmanju moguću visinu stuba smeše u kiveti i jednostavne laboratorijske obrade u trenutku kada lice koje izvodi ispitivanja, nakon centrifugiranja, razdeli faze.

4. Kada se definišu ispitivani uslovi pod kojima će se razdeliti čvrsta faza (zemljište) od tečne faze (rastvor), važno je uzeti u obzir mogućnost postojanja treće, "pseudo - faze", koloida. Ove čestice, manje od 0,2 μm, mogu imati važan uticaj na celokupni mehanizam adsorpcije supstance u suspenziji zemljišta. Ako se centrifugira na opisani način, koloidi se zadržavaju u tečnoj fazi i analizirani zajedno sa njom. Ovim se podaci o njihovom uticaju gube.

Ako laboratorija koja izvodi studiju raspolaže opremom koja omogućuje ultracentrifugiranje ili ultrafiltraciju, adsorpcija/desorpcija se može proučavati detaljnije, što uključuje i mogućnost dobijanja podataka o adsorpciji ispitivane supstance na koloide. U ovom slučaju, u cilju razdeljivanja tri faze (zemljišta, koloida i rastvora) potrebno je izvršiti ultracentrifugiranje brzinom od 60.000 okretaja/min, odnosno ultrafiltraciju filtrom poroznosti od 100.000 Daltona. U skladu sa tim, da bi se analizi na prisustvo supstance podvrgle sve tri faze, potrebno je adekvatno promeniti i protokol metode ispitivanja.

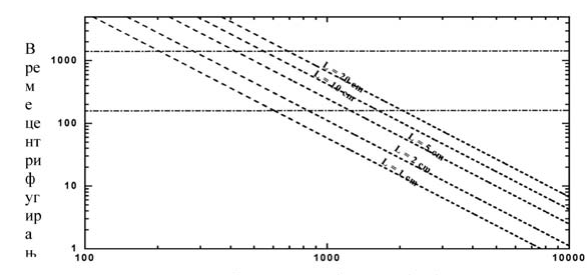
Slika 1a.



Brzina centrifugiranja (rpm)

Varijacije vremena centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifuge (rpm) za zemljišta različite gustine (ρs). Rt = 10 cm, Rb - Rt = 10 cm, η = 8,95 × 10-3 g/scm-1 i ρaq = 1,0 g/cm3 na 25°C.

Slika 1b.



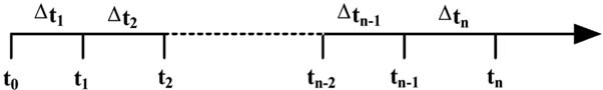
Brzina centrifugiranja (rpm)

Varijacije vremena centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifuge (rpm) za različite visine stuba smeše u kiveti (Rb - Rt) = L; Rt = 10 cm, η = 8,95 × 10-3 g/s cm-1, ρaq = 1,0 g/cm3 na 25°C i ρs = 2,0 g/cm3.

**Deo šesti**

**IZRAČUNAVANJE ADSORPCIJE A (%) I DESORPCIJE D (%)**

Vremenska skala postupka je:



Za sva izračunavanja podrazumeva se da je ispitivana supstanca stabilna i da se ne adsorbuje značajno na zidove posude.

ADSORPCIJA A (%)

Paralelna metoda

Procenat adsorpcije računa se za svaku ispitivanu posudu u kojoj se nalazi ispitivani uzorak (i), i to u svakoj od vremenskih tačaka (ti), prema jednačini:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ati = | msads(ti) x 100 | % | 1 |
| m0 |

Uslovi iz ove jednačine mogu se izračunati na sledeći način:

m0 = C0 x V0g 2

msads (ti) = m0 - Caqads(ti) x V0g 2

pri čemu:

Ati jeste procenat adsorpcije (%) u tački vremena ti;

msads (ti) jeste masa (mg) ispitivane supstance u zemljištu u vremenu ti kada je analiza obavljena;

m0 jeste masa (mg) ispitivane supstance u ispitivanoj posudi sa ispitivanom uzorkom, na početku ispitivanja;

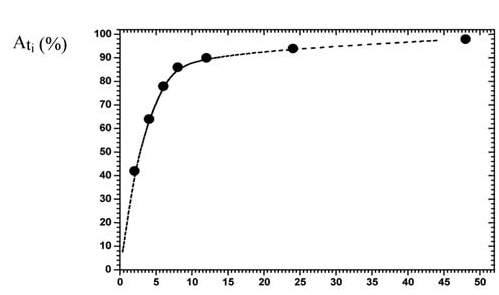
C0 jeste početna masena koncentracija (mg/cm3) ispitivanog rastvora koja se nalazi u dodiru sa zemljištem;

Csads (ti) jeste masena koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi u vremenu ti u kom je rađena analiza (mg/cm3); ova koncentracija određena je analitički uzimajući u obzir vrednosti dobijene u slepim probama;

V0 jeste početna zapremina ispitivanom rastvora koji se nalazi u dodiru sa zemljištem (cm3).

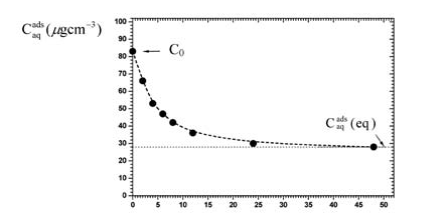
Vrednosti procenta adsorpcije Ati ili Csads (ti) grafički su prikazani u funkciji vremena, pa se određuje vreme potrebno da se dostigne ravnotežno stanje adsorpcije. Primeri krivih dati su na Slici 1, odnosno Slici 2.

Slika 1. Grafički prikaz ravnotežnog stanja adsorbcije



Ravnotežno vreme ti (h)

Slika 2. Masene koncentracije ispitivane supstanci u tečnoj fazi (Caq) u funkciji vremena



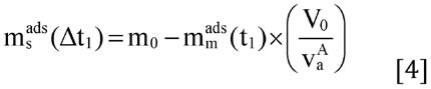
Ravnotežno vreme ti (h)

Redna metoda

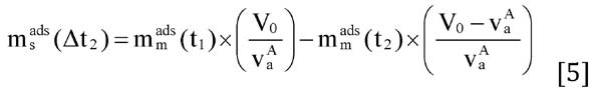
Sledeće jednačine uzimaju u obzir da se adsorbcija prati merenjem ispitivane supstance u malim alikvotima tečne faze u definisanim vremenskim intervalima.

Tokom svakog vremenskog intervala količina supstance koja se adsorbuje na zemljište računa se kao:

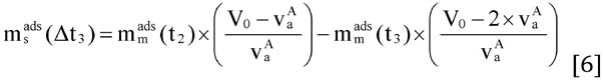
- za prvi interval vremena Δt1 = t1 - t0



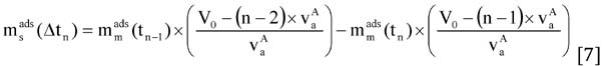
- za drugi vremenski interval Δt2 = t2 - t1



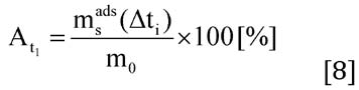
- za treći vremenski interval Δt3 = t3 - t2



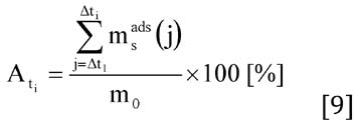
- za *n*-ti interval Δtn = tn - tn - 1



Procenat adsorpcije u svakom vremenskom intervalu AΔti računa se prema formuli:



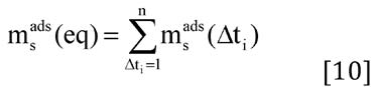
Dok se procenat adsorpcije (Ati) u tački vremena ti računa formulom:



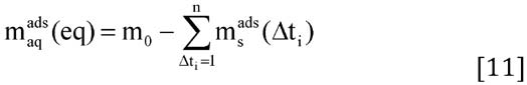
Vrednosti adsorpcije Ati ili ADti (u zavisnosti od potreba studije) grafički se prikazuju u funkciji vremena, a određuje se vreme nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije.

U trenutku dostizanja ravnotežnog stanja teq:

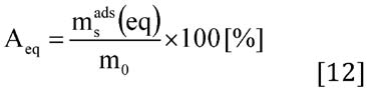
- masa ispitivane supstance adsorbovana na zemljište je:



- masa ispitivane supstance u rastvoru je:



- procenat adsorbcije u ravnotežnom stanju je:



pri čemu navedeni parametri:

msads (Δt1), msads (Δt2)...msads (Δtn), jesu masa (μg) supstance adsorbovane na zemljište u toku vremenskih intervala Δt1, Δt2... Δtn;

mmads (Δt1), mmads (Δt2)...mmads (Δtn), jesu masa (μg) supstance izmerena u alikvotu VaA u tačkama vremena t1, t2... tn;

msads (eq) jeste masa supstance adsorbovana na zemljište u ravnotežnom stanju adsorbcije (μg);

maqads (eq) jeste masa supstance u rastvoru u ravnotežnom stanju adsorbcije (μg);

VaA jeste zapremina alikvota u kome je merena ispitivane supstanca (cm3);

AΔti jeste procenat adsorpcije u vremenskom intervalu Δti (%);

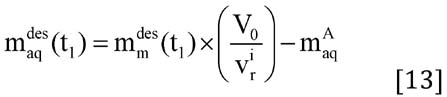
Aeq jeste procenat adsorpcije u ravnotežnom stanju adsorbcije(%).

DESORPCIJA D (%)

Početno vreme (t0) ispitivanja kinetike desorpcije, smatra se za trenutak (nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorpcije) u kom je najveća zapremina rastvora ispitivane supstance zamenjena jednakom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2.

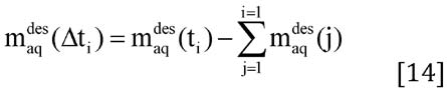
Paralelna metoda

U vremenu ti masa ispitivane supstance u tečnoj fazi meri se iz *i*-te kivete vri a desorbovana masa računa se formulom:



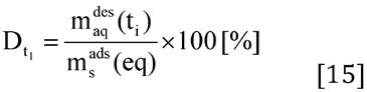
U trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ti= teq, pa je maqdes (t1) = maqdes (eq).

Masa ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskog intervala (Δti) je:

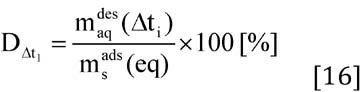


Procenat desorpcije se računa:

- u tački vremena ti iz formule:



- u toku vremenskog intervala (Dti) iz formule:



pri čemu:

Dti jeste procenat (%) desorpcije u tački vremena ti;

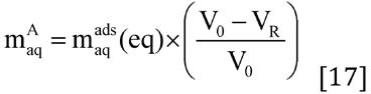
DΔti jeste procenat (%) desorpcije koji odgovara vremenskom intervalu Dti;

maqdes (ti) jeste masa (mg) ispitivane supstance desorbovana u tački vremena ti;

maqdes (Δti) jeste masa (mg) ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskog intervala Δti

mmdes (ti) jeste masa (mg) ispitivane supstance analitički izmerena u tački vremena ti u rastvoru zapremine vri koja je uzeta za analizu;

maqA jeste masa (mg) ispitivane supstance koja preostaje nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije zbog nekompletne izmene zapremine;



maqads (eq) jeste masa (mg) ispitivane supstance u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije;

VR jeste zapremina supernatanta uklonjena nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 (cm3);

vri jeste zapremina (cm3) rastvora uzetog iz *i*-tekivete za merenje ispitivane supstance, u eksperimentu kinetike desorpcije.

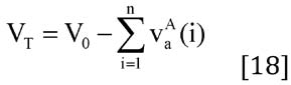
Vrednosti desorpcije Dti i DDti (u skladu sa potrebama studije) grafički se prikazuju u funkciji vremena i određuje se vreme nakon kojeg se dostiže ravnotežno stanje desorpcije.

Redna metoda

Jednačine date u ovom odeljku uzimaju u obzir da je protokol ispitivanja adsorbcije koji je prethodio ovome, podrazumevao merenje ispitivane supstance u malim alikvotima (vri) tečne faze (videti u odeljku 1.9. ove metode). Podrazumeva se da je:

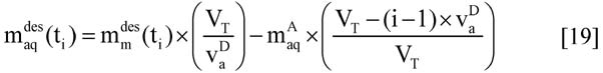
1. zapremina supernatanta, uklonjenog iz epruvete nakon ispitivanja kojim se proučavala kinetika adsorpcije, zamenjen jednakom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 (VR) i da je

2. ukupna zapremina tečne faze koja je u dodiru sa zemljištem (VT) u toku ispitivanja kojim se proučava kinetika desorpcije ostala nepromenjena i data formulom:



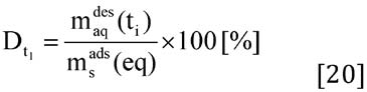
U trenutku ti:

- masa ispitivane supstance meri se u malim alikvotima (vaD), a desorbovana masa se računa primenom formule:



- u momentu dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ti = teq, pa je maqdes (t1) = maqdes (eq);

- procenat desorpcije Dt računa se iz sledeće formule:

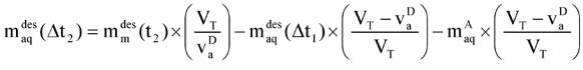


U vremenskom intervalu (Δti):

- za prvi vremenski interval Δt1 = t1 - t0, količina desorbovane supstance je:

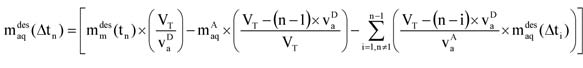
C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s132.gif

- za drugi vremenski interval Δt2 = t2 - t1, količina desorbovane supstance je:

i

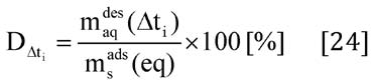
C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s134.gif

- za *n*-ti vremenski interval Δtn = tn- tn-1, količina desorbovane supstance je:

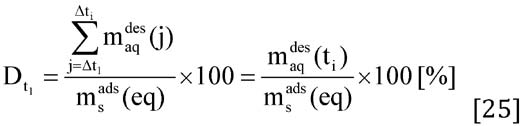
i

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s136.gif

Na kraju, procenat desorpcije u svakom vremenskom intervalu DΔti se računa pomoću sledeće formule:



Procenat desorpcije u vremenu ti je:



pri čemu navedeni parametri:

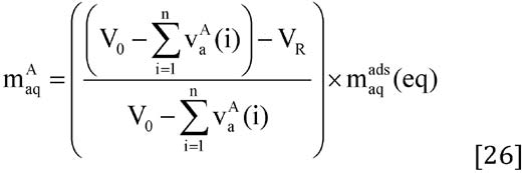
msdes (Δt1), msdes (Δt2)...msdes (Δtn), jesu masa (mg)supstance koja ostaje adsorbovana na zemljištu nakon vremenskih intervala Δt1, Δt2... Δtn;

maqdes (Δt1), maqdes (Δt2)...maqdes (Δtn), jesu masa(mg) ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskih intervala Δt1, Δt2... Δtn;

mmdes (Δt1), mmdes (Δt2)...mmdes (Δtn), jesu masa (mg) supstance izmerena u alikvotima u tačkama vremena t1, t2... tn;

VT jeste ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem u toku ispitivanja kinetike desorpcije izvedenog rednom metodom (cm3);

maqA jeste masa (mg) ispitivane supstance koja ostaje nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije zbog nekompletne izmene zapremine;



VR jeste zapremina supernatanta uklonjena iz epruvete nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora CaCl2 (cm3);

vaD jeste zapremina (cm3) alikvota uzetog iz i-te epruvete za analizu u toku ispitivanja kinetike desorpcije izvedenog rednom metodom;

C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s140.gif

**Deo sedmi**

**ADSORPCIJA - DESORPCIJA U ZEMLJIŠTU: FORMULARI ZA IZVEŠTAJ**

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105° C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

PRIKLADNOST ANALITIČKE METODE

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Težina zemljišta | g |  |
| Zemljište: suva masa | g |  |
| Zapremina CaCl2sol. | cm3 |  |
| Nominalna koncentracija finalnog rastvor | g/cm3 |  |
| Analitička koncentracija finalnog rastvor | g/cm3 |  |

Princip korišćene analitičke metode:

Kalibracija analitičke metode:

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

|  |  |
| --- | --- |
| Praćena analitička metodologija: | Indirektna □ Paralelna □ Redna □ |
|  | Direktna □ |

Metoda ispitivanja adsorpcije: ispitivani uzorci

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Simbol | Jedinica mere | Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | | Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | | Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | | Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | |
| Epruveta br. |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Težina zemljišta | - | g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Zemljište: suva masa | mzemljišta | g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Zapremina vode u izvaganom zemljištu (izračunata) | VWS | cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Zapremina 0,01 M CaCl2 rastvora za ravnotežu zemljišta |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Zapremina osnovnog rastvora |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ukupna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem | V0 | cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Početna koncentracija ispitivanog rastvora | C0 | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Masa ispitivane supstance na početku ispitivanja | m0 | g |  |  |  |  |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nakon mešanja i centrifugiranja | | | | | | | | | | |
| INDIREKTNA METODA | | | | | | | | | | |
| Paralelna metoda | | | | | | | | | | |
| Koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi (uključujući i slepu probu) | Caqads(ti) | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Redna metoda | | | | | | | | | | |
| Izmerena masa ispitivane VaA supstance u alikvotima | mmads(ti) | g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| DIREKTNA METODA | | | | | | | | | | |
| Masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište | msads(ti) | g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Izračunavanje adsorpcije | | | | | | | | | | |
| Adsorpcija | Ati | % |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | A∆ti | % |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Srednja vrednost |  | |  | |  | |  | |  | |
| Konstanta adsorpcije | Kd | cm3/g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Srednja vrednost |  |  |  | |  | |  | |  | |
| Konstanta adsorpcije | Kos | cm3/g |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Srednja vrednost |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

Metoda ispitivanja adsorpcije: slepe probe i kontrolni uzorci

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Simbol | Jedinica mere | Slepa proba | | Slepa proba | | Kontrola | |
| Epruveta br. |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Težina zemljišta |  | g |  |  |  |  | 0 | 0 |
| Sadržaj vode u izmerenom zemljištu (izračunato) |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Dodata zapremina 0,01 M rastvora CaCl2 |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Dodata zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance |  | cm3 | 0 | 0 |  |  |  |  |
| Ukupna zapremina tečne faze (izračunato) |  | cm3 |  |  |  |  | - | - |
| Početna koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Nakon mešanja i centrifugiranja | | | | | | | | |
| Koncentracija u tečnoj fazi |  | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |

Napomena: Ako je potrebno dodati kolone.

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105° C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

Maseni balans

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Simbol | Jedinica mere |  |  |  |  |
| Epruveta br. |  |  |  |  |  |  |
| Težina zemljišta | - | g |  |  |  |  |
| Zemljište: suva masa | mzemljišta | g |  |  |  |  |
| Zapremina vode u odmerenom zemljištu (izračunato) | VWS | ml |  |  |  |  |
| Zapremina 0,01 M rastvora CaCl2 za uravnoteženje zemljišta |  | ml |  |  |  |  |
| Zapremina osnovnog rastvora |  | cm3 |  |  |  |  |
| Ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem | V0 | cm3 |  |  |  |  |
| Početna koncentracija ispitivanog rastvora | C0 | g/cm3 |  |  |  |  |
| Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | - | h |  |  |  |  |
| Nakon mešanja i centrifugiranja | | | | | | |
| Koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja uključujući korekciju za slepu probu | Caqads(eq) | g/cm3 |  |  |  |  |
| Vreme dostizanja ravnotežnog stanja | teq | h |  |  |  |  |
| Prvo razblaživanje sa rastvaračem | | | | | | |
| Uklonjena zapremina tečne faze | Vrec | cm3 |  |  |  |  |
| Dodata zapremina rastvarača | ∆V | cm3 |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Prva ekstrakcija rastvaračem | | | | | | | | |
| Signal analiziran u rastvaraču | sE1 | var. |  |  |  |  |  |  |
| Koncentracija ispitivane supstance u rastvaraču | CE1 | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Masa supstance ekstrahovane iz zemljišta i sa zidova Ispitivanja posuda | mE1 | g |  |  |  |  |  |  |
| Drugo razblaživanje sa rastvaračem | | | | | | | | |
| Uklonjena zapremina tečne faze | ∆Vs | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Dodata zapremina rastvarača | ∆V' | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Druga ekstrakcija rastvaračem | | | | | | | | |
| Signal analiziran u rastvaraču | SE2 | var. |  |  |  |  |  |  |
| Koncentracija ispitivane supstance u rastvaraču | CE2 | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Masa supstance ekstrahovane iz zemljišta i sa zidova Ispitivanja posuda | mE2 | g |  |  |  |  |  |  |
| Ukupna masa ispitivane supstance ekstrahovana u dva koraka | mE | g |  |  |  |  |  |  |
| Maseni balans | MB | % |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105° C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

Adsorpcione izoterme

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Simbol | Jedinica mere |  |  |  |  |  |  |
| Epruveta br. |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Težina zemljišta | - | g |  |  |  |  |  |  |
| Zemljište: suva masa | E | g |  |  |  |  |  |  |
| Sadržaj vode u izmerenom zemljištu (izračunato) | VWS | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Dodata zapremina 0,01 M rastvora CaCl2 |  | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Dodata zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance |  | cm3 | 0 | 0 |  |  |  |  |
| Ukupna zapremina tečne faze (izračunato) | V0 | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Koncentracija rastvora | C0 | cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Vreme za dostizanje ravnotežnog stanja | - | h |  |  |  |  |  |  |
| Nakon mešanja i centrifugiranja | | | | | | | | |
| Koncentracija supstance u tečnoj fazi uključujući i korekciju na slepu probu | Caqads(eq) | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |
| Temperatura |  | °C |  |  |  |  |  |  |
| Adsorbovana masa po jedinici zemljišta | Csads(eq) | g/cm3 |  |  |  |  |  |  |

Regresiona analiza:

Vrednost KFads:

Vrednost 1/n:

Regresioni koeficijent r2:

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

|  |  |
| --- | --- |
| Sadržaj suve mase zemljišta (105 °C, 12 sati): | % |

|  |  |
| --- | --- |
| Temperatura: | °C |

|  |  |
| --- | --- |
| Praćena analitička metodologija: | Indirektna □ Paralelna □ Redna □ |

Ispitivanje desorpcije

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | Simbol | Jedinica mere | Vremenski interval | Vremenski interval | Vremenski interval | Vremenski interval |
| Epruveta br. (iz adsorpcionog koraka) | |  |  |  |  |  |  |
| Masa supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja | | msads(eq) | g |  |  |  |  |
| Uklonjena zapremina tečne faze, zamenjena 0,01 M rastvorom CaCl2 | | VR | cm3 |  | • |  |  |
| Ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem | PM SM | V0 VT | cm3 cm3 |  |  |  |  |
| Masa ispitivane supstance zaostala nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije usled nekompletne izmene zapremine | | maqA | g |  |  |  |  |
| Kinetika desorpcije | | | | | | | |
| Izmerena masa supstance desorbovana u vremenu ti; | | mmdes(ti) | g |  |  |  |  |
| Zapremina rastvora uzetog iz kivete (i) za merenje ispitivane supstance | PM | Vir | cm3 |  |  |  |  |
| SM | VaD | cm3 |  |  |  |  |
| Masa supstance desorbovane sa zemljišta u vremenu ti (izračunato) | | maqdes(ti) | g |  |  |  |  |
| Masa supstance desorbovane sa zemljišta u vremenskom intervalu ∆ti (izračunato) | | maqdes(∆ti) | g |  |  |  |  |
| Procenat desorpcije | | | | | | | |
| Desorpcija u vremenu ti | | DTi | % |  |  |  |  |
| Desorpcija u vremenskom intervalu ∆Ti | | D∆Ti | % |  |  |  |  |
| Prividni koeficijent desorpcije | | Kdes |  |  |  |  |  |

PM: paralelna metoda   
SM: redna metoda

**C.19. ODREĐIVANJE KOEFICIJENTA ADSORPCIJE (Koc) NA ZEMLJIŠTU I OTPADNOM MULJU UPOTREBOM TEČNE HROMATOGRAFIJE VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 121 (2000).

*1.1. UVOD*

Adsorpciono ponašanje supstanci u zemljištu, odnosno otpadnim muljevima, opisuju parametri koji se određuju metodom ispitivanja C.18. koja je data u ovom prilogu. Važan parametar je adsorpcioni koeficijent koji se definiše kao odnos između koncentracije supstance u zemljištu/mulju i koncentracije supstance u vodenoj fazi u ravnotežnom stanju adsorpcije. Koeficijent adsorpcije normalizovan na sadržaj organskog ugljenika u zemljištu (u daljem tekstu: Koc) koristan je pokazatelj kapaciteta vezivanja hemikalije za organsku materiju zemljišta odnosno otpadnog mulja i omogućuje međusobno poređenje različitih hemikalija. Ovaj parametar se može utvrditi putem korelacija sa rastvorljivošću supstance u vodi i njenim koeficijentom raspodele u sistemu n-oktanol/voda**1,2,3,4,5,6,7**.

Za utvrđivanje koeficijenta adsorpcije u zemljištu i otpadnom mulju, koristi se tečna hromatografija visokih performansi (u daljem tekstu: HPLC**8**). Ove procene su pouzdanije od onih dobijenih QSAR izračunavanjima**9**. Kao metoda koja služi za procenu, ona ne može u potpunosti da zameni studije ravnotežnog stanja iz metode C.18. koja je data u ovom prilogu. Utvrđeni Koc može biti od koristi pri izboru adekvatnih parametara za ispitivanje adsorpcije/desorpcije prema metodi C.18. Primenom jednačine [3] (videti odeljak 1.2. ove metode) izračunava se koeficijent raspodele, odnosno Frojndlihova konstanta adsorpcije.

*1.2. DEFINICIJE*

Koeficijent raspodele (u daljem tekstu: Kd) jeste odnos između ravnotežnih koncentracija (C) ispitivane supstance, rastvorene u dvofaznom sistemu koji se sastoji od sorbensa (zemljište ili otpadni mulj) i vodene faze. Ukoliko se koncentracije u obe faze iskažu kao težinski odnos, ova vrednost je broj bez jedinice mere. Ako se koncentracija u vodenoj fazi iskazuje kao odnos težine i zapremine, jedinice u kojima će biti iskazan Kd su ml/g. Kd može varirati u zavisnosti od sorpcijskih svojstava i zavisi od koncentracije.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kd = | Czemljišta | ili | Cmulja |  | |
| Caq | Caq | 1 |  |

pri čemu:

Czemljišta jeste koncentracija (mg/g) ispitivane supstance u zemljištu u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja;

Cmulja jeste koncentracija (mg/g) ispitivane supstance u mulju u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja;

Caq jeste koncentracija (mg/g, mg/ml) ispitivane supstance u vodenoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja.

Frojndlihova konstanta adsorpcije (u daljem tekstu: Kf) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu, odnosno otpadnom mulju (x/m) u trenutku kada ravnotežna koncentracija Caq u vodenoj fazi iznosi jedan. Kf se izražava u mg/g sorbensa. U zavisnosti od svojstava sorbensa, njegova vrednost može varirati.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| log | x | = log Kf + | l | logCaq | 2 |
| m | n |

Pri čemu:

x/m jeste količina ispitivane supstance x (μg), adsorbovane na količinu sorbensa m (g) u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja;

l/n jeste nagib Frojndlihove adsorpcione izoterme;

Caq jeste koncentracija (mg/g) ispitivane supstance u vodenoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| AtCaq = 1; | log Kf = log | x |  |
| m |  |

Koeficijent adsorpcije (u daljem tekstu: Koc) jeste normalizovan Kd, odnosno Kf, na sadržaj organskog ugljenika (foc) u sorbensu. Koc jeposebno u slučaju nejonizovanih hemikalija, približni pokazatelj obima adsorpcije između supstance i sorbensa i omogućava međusobno poređenje različitih hemikalija. U zavisnosti od veličine Kd i Kf, Koc može biti broj bez jedinice mere ili može biti iskazan u ml/g ili u mg/g organske materije.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Koc = | Kd | bez jedinice mere ili u ml/g, odnosno, Koc = | Kr | g/g | 3 |
| foc | foc |

Odnos između Koc i Kd nije uvek linearan, pa vrednosti Koc mogu varirati od zemljišta do zemljišta, ali je njihova varijabilnost znatno manja u poređenju sa varijabilnošću vrednosti Kd, odnosno Kf.Koc se izvodi dedukcijom iz faktora kapaciteta (k') upotrebom kalibracione krive u kojoj je log k' iskazan u odnosu na log Koc izabranih referentnih jedinjenja.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| k' = | tR - t0 | 4 |  |
| t0 |

pri čemu:

tR jeste vreme (minuti) zadržavanja ili retenciono vreme ispitivane i referentne supstance, koje se beleži pri HPLC;

t0 jeste HPLC "mrtvo vreme"u minutima(videti odeljak 1.8.2. ove metode).

Kow jeste koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda, odnos između koncentracija supstance rastvorene *un*-oktanolu i one rastvorene u vodi. Ova vrednost iskazuje se kao broj bez jedinice mere.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Pow = | Coktanol | (=Kow) | 5 |  |
| Caq |

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Pre upotrebe ove metode neophodno je poznavati strukturnu formulu, čistoću i konstantu disocijacije (ako je primereno) ispitivane supstance. Korisno je raspolagati i podacima o rastvorljivosti, podeonom koeficijentu oktanol-voda i svojstvima hidrolize ispitivane supstance.

Da bi izmereni podaci o retencionom vremenu ispitivane supstance, dobijeni primenom HPLC, korelirali sa adsorpcionim koeficijentom Koc, izraditi kalibracionu krivu u kojoj je log Koc iskazan u odnosu na log k'. Potrebno je upotrebiti najmanje šest referentnih tačaka, od kojih najmanje jednu iznad i jednu ispod očekivane vrednosti ispitivane supstance. Tačnost metode značajno se povećava ukoliko se koristi referentna supstanca koja je po strukturi bliska ispitivanoj supstanci. Ako takvi podaci nisu dostupni, izbor primerenih kalibracionih supstanci predstavlja odgovornost lica koje izvodi ispitivanje. U tom slučaju je potrebno izabrati opšte primenljiv set supstanci. Supstance i vrednosti Koc koje se ovom prilikom mogu upotrebiti koriste se i u ispitivanju otpadnog mulja, a date su u Tabeli 1. iz Dela prvog ove metode. Ostale, koje se koriste u ispitivanju zemljišta date su u Tabeli 3. iz Dela prvogove metode. Izbor drugih kalibracionih supstanci obrazložiti.

*1.4. PRINCIP METODE*

HPLC se izvodi na analitičkim kolonama koje se pakuju zajedno sa tržišno dostupnom cijanopropilnom čvrstom fazom, koja sadrži lipofilne i polarne grupe. Za ove namene koristi se umereno polarna stacionarna faza čiju osnovu čini silikagel:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| - O - Si |  | - CH2 - CH2 - CH2 |  | - CN |  |
| silikagel |  | nepolarni deo |  | polarni deo |  |

Princip metode sličan je načelu na kom se zasniva i metoda ispitivanja A.8. koja je data u ovom pravilniku (podeoni koeficijent, HPLC metoda ispitivanja). Dok prolazi kroz kolonu zajedno sa mobilnom fazom, ispitivana supstanca ostvaruje interakciju sa stacionarnom fazom. Kao rezultat raspodele između mobilne i stacionarne faze, ispitivana supstanca se zadržava, tj. njen prolaz kroz kolonu se usporava. Dvojaki sastav stacionarne faze, tj. postojanje polarnih i nepolarnih grupa, omogućuje interakciju polarnih i nepolarnih grupa molekula, sličnu onoj koja se zbiva pri interakciji sa organskom materijom u okolnostima kada matriks čini zemljište, odnosno otpadni mulj. Ovo omogućava uspostavljanje odnosa između vremena retencije na koloni i koeficijenta adsorpcije na organsku materiju.

Vrednost pH ima značajan uticaj na adsorpciono ponašanje supstanci, naročito polarnih. Ako se radi o poljoprivrednim zemljištima, odnosno otpadnom mulju sa postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda, pH se najčešće kreće između 5,5 i 7,5 jedinica. Ako se radi o supstancama podložnim jonizaciji, neophodno je ispitati i njihov jonizovani i nejonizovani oblik u adekvatnim puferima, ali samo u slučaju kada će se pri pH 5,5 do 7,5 disosovati barem 10% ispitivane supstance.

Kako se pri vrednovanju koristi isključivo odnos između retencije na HPLC koloni i koeficijenta adsorpcije, nije potrebno primeniti bilo kakvu kvantitativnu analitičku metodu, ali je potrebno odrediti retenciono vreme. Ukoliko je na raspolaganju prikladan set referentnih supstanci i ako se ispitivanje može izvesti u standardnim ispitivanim uslovima, ova metoda predstavlja brz i efikasan način određivanja koeficijenta adsorpcije Koc.

*1.5. PRIMENLJIVOST METODE*

HPLC metoda je primenljiva na hemijske supstance (obeležene i neobeležene) za koje je dostupan adekvatan sistem detekcije (npr. spektrofotometar, detektor radioaktivnosti) i koje su u toku trajanja ispitivanja dovoljno stabilne. Metoda može biti korisna za ispitivanje hemikalija koje je teško proučavati u drugim ispitivanim sistemima (npr. isparljive supstance; supstance koje u vodi nisu rastvorljive u koncentraciji koja bi bila analitički merljiva; supstance koje imaju veliki afinitet za površine inkubacionih sistema). Metoda se može upotrebiti za ispitivanje smeša koje pri eluaciji stvaraju nerastvorne veze. U ovom slučaju je neophodno navesti gornje i donje granične vrednosti log Koc jedinjenja koja čine ispitivanu smešu.

Pri tumačenju rezultata dobijenih HPLC metodom, probleme mogu pričinjavati različite nečistoće, ali dokle god se ispitivana supstanca može jasno i nedvosmisleno analitički odrediti i od njih odvojiti, ovi problemi nisu od većeg značaja.

Metoda je vrednovana za supstance date u Delu drugom Tabela 1 ove metode, a bila je primenjena i pri ispitivanju niza drugih hemikalija, koje spadaju u sledeće hemijske grupe:

- aromatični amini (npr. trifluralin, 4-kloroanilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, *n*-metilanilin,1-naftilamin);

- aromatične estere karboksilne kiseline (npr. metilester benzoeve kiseline, etilester 3,5-dinitrobenzoeve kiseline);

- aromatične ugljovodike (npr. toluen, ksilen, etilbenzen, nitrobenzen);

- estre ariloksifenoksipropionske kiseline (npr. diklofop-metil, fenoksaprop-etil, fenoksaprop-P-etil);

- fungicide iz grupa benzimidazola i imidazola (npr. karbendazim, fuberidazol, triazoksid);

- amide karboksilne kiseline (npr. 2-hlorobenzamid, N,N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid,n-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid);

- hlorovane ugljovodike (npr. endosulfan, DDT, heksaklorobenzen, kvintozen, 1,2,3-triklorobenzen);

- organofosfatne insekticide (npr. azinfos-metil, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);

- fenole (npr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorofenol, 2,4,6-triklorofenol, 1-naftol);

- derivate fenilureje (npr. izoproturon, monolinuron, pensikuron);

- pigmentne boje (npr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

- poliaromatične ugljovodike (npr. acenaften, naftalen);

- 1,3,5-triazinske herbicide (npr. prometrn, propazin, simazin, terbutrin);

- derivate triazola (npr. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoda se ne može primeniti za ispitivanje supstanci koje reaguju sa efluentom ili sa stacionarnom fazom. Nije primenljiva ni za ispitivanje supstanci koje ulaze u interakciju sa neorganskim sastojcima na specifičan način (npr. kompleksiranje sa mineralima iz gline). Metoda može biti neadekvatna za površinski aktivne supstance, neorganska jedinjenja i umerene ili jake organske kiseline i baze. Njome je moguće odrediti log Koc vrednosti koje se kreću u opsegu od 1,5 do 5,0. Supstance podložne jonizaciji se mere pomoću puferisane mobilne faze, ali se preduzimaju mere opreza kako ne bi došlo do precipitacije komponenti pufera ili ispitivane supstance.

*1.6. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.6.1. Tačnost**

U normalnim uslovima koeficijent adsorpcije ispitivane supstance može se odrediti do unutar ± 0,5 log jedinice vrednosti utvrđene metodom ravnotežnog stanja (videti Deo drugi Tabela 1 ove metode). Tačnost se može povećati upotrebom referentnih supstanci strukturno bliskih ispitivanoj supstanci.

**1.6.2. Ponovljivost**

Određivanja obavljati najmanje u duplikatu. Vrednosti log Koc izvedene iz pojedinačnih merenja ne smeju varirati za više od 0,25 log jedinica.

**1.6.3. Obnovljivost**

Iskustva stečena primenom ove metode, govore u prilog njene valjanosti. Ispitivanje HPLC metode ispitivanja, kojom je obuhvaćeno 48 supstanci (većinom pesticida) o čijem Koc na zemljištima postoje pouzdani podaci, rezultiralo je koeficijentom korelacije od R = 0,95**10,11**.

Da bi se ova metoda unapredila i vrednovala urađeno je međulaboratorijsko poređenje u kojem je učestvovalo 11 laboratorija**12**. Rezultati su dati u Delu drugom Tabela 2. ove metode.

*1.7. OPIS METODE*

**1.7.1. Preliminarno utvrđivanje koeficijenta adsorpcije**

Kod nejonizovanih supstanci kao pokazatelji obima adsorpcije mogu poslužiti podeoni koeficijent oktanol-voda Pow (= Kow) i do određene mere rastvorljivost u vodi. Ovi parametri se mogu koristiti i za preliminarno pronalaženje opsega koncentracija ispitivane supstance. Za nekoliko grupa hemikalija objavljeno je niz korisnih korelacija1,2,3,4,5,6,7.

**1.7.2. Aparatura**

Potrebno je imati tečni hromatograf na koji je priključena nepulsirajuća pumpa i pogodan uređaj za detekciju. Preporučuje se upotreba ventila za ubrizgavanje sa injekcijskom petljom. Upotrebljavaju se na tržištu dostupne cijanopropilne kolone sa podlogom od silikagela (npr. Hypersil i Zorbax CN). Između sistema za ubrizgavanje i analitičke kolone može se postaviti zaštitna kolona od istog materijala. Kolone različitih dobavljača mogu znatno varirati u efikasnosti razdvajanja. Treba težiti da se dostignu sledeći faktori kapaciteta k': log k' > 0,0 za log Koc = 3,0 i log k' > -0,4 za log Koc = 2,0 kada se kao mobilna faza koristi metanol/voda u odnosu od 55% prema 45%.

**1.7.3. Mobilne faze**

Ispitano je nekoliko mobilnih faza i preporučuju se:

1) metanol/voda (55/45% zapreminskih%);

2) metanol/0.01 M citratni pufer pH 6,0 (55/45% v/v).

Za pripremanje rastvarača za eluaciju koriste se metanol HPLC čistoće i destilovana voda ili citratni pufer. Pre upotrebe iz smeše se odstranjuje gas. Eluacija je izokratična. Ako nije primereno upotrebiti smeše metanola i vode, može se pokušati sa drugim smešama organskog rastvarača/vode, npr. smešama etanola/vode ili acetonitrila/vode. Za jedinjenja podložna jonizaciji preporučuje se upotreba pufera kako bi se stabilizovala pH vrednost. Preduzeti mere opreza kako bi se izbegla precipitacija soli i propadanje kolone koji se mogu javiti pri upotrebi nekih smeša organske faze i pufera.

Pri izvođenju ove metode ne smeju se koristiti aditivi kao što su reagensi na bazi jonskih parova, s obzirom na njihov mogući uticaj na sorpcijska svojstva stacionarne faze. Ovakve promene stacionarne faze mogu biti ireverzibilne, pa se ispitivanja u kojima se koriste aditivi obavezno obavljaju na odvojenim kolonama.

**1.7.4. Rastvorljive supstance**

Ispitivane supstance i referentne supstance rastvoriti u mobilnoj fazi.

*1.8. IZVOĐENJE METODE*

**1.8.1. Ispitivani uslovi**

Tokom merenja beležiti temperaturu. Preporučuje se korišćenje uređaja u kome je temperatura odeljka sa kolonama kontrolisana, kako bi se garantovalo da su uslovi pod kojima su obavljeni kalibracija, utvrđivanje prirode ispitivane supstance i njeno merenje u toku trajanja celog ispitivanja bili nepromenjeni.

**1.8.2. Određivanje "mrtvog vremena" t0**

Za određivanje "mrtvog vremena" t0 (kada vršna vrednost ispitivane supstance dostigne i aktivira detektor) mogu se koristiti dve metode (videti odeljak 1.2. ove metode).

*1.8.2.1. Određivanje "mrtvog vremena" t0 homolognim serijama*

Dokazano je da primena ovog postupka rezultira pouzdanim i standardizovanim t0 vrednostima (videti metodu A.8: koeficijent raspodele u sistemu *n*-oktanol/voda; HPLC metoda ispitivanja koja je data u ovom prilogu).

*1.8.2.2. Određivanje "mrtvog vremena" t0 inertnim supstancama koje kolona ne zadržava*

Ova tehnika utemeljena je na ubrizgavanju rastvora formamida, ureee ili natrijum nitrata. Merenja obaviti najmanje u duplikatu.

**1.8.3. Određivanje retencionih vremena tR**

Referentne supstance izabrati na način opisan u odeljku 1.3. ove metode. Mogu se ubrizgati kao standardna smeša, kako bi se utvrdilo njihovo retenciono vreme, pod uslovom da je potvrđeno da na retenciono vreme ni jednog od referentnih standarda ne utiče prisutnost ostalih. Kalibraciju obavljati u pravilnim vremenskim razmacima, najmanje dva puta dnevno, kako bi se uzele u obzir neočekivane promene u efikasnosti kolone. U cilju postizanja najboljih rezultata i prevencije otklona u retencionim vremenima, kalibracija se vrši pre i nakon ubrizgavanja ispitivane supstance. Ispitivane supstance se ubrizgavaju zasebno u najmanjim mogućim količinama (kako bi se izbeglo preopterećenje kolone), a potom se određuju njihova retenciona vremena.

Da bi merenja bila pouzdanija, određivanja se obavljaju najmanje u duplikatu. Vrednosti log Koc izvedene iz pojedinačnih merenja ne smeju varirati za više od 0,25 log jedinica.

**1.8.4. Procena**

Faktori kapaciteta k' računaju se iz "mrtvog vremena" i retencionih vremena tR izabranih referentnih supstanci, u skladu sa jednačinom 4 (videti odeljak 1.2. ove metode). Podaci o logk' referentnih supstanci se potom grafički prikazuju u odnosu na vrednosti njihove log Koc, dobijene metodom ravnotežnog stanja navedene u Delu drugom Tabele 1 i 3 ove metode. Potom se koristeći krivu za određivanje vrednosti log Koc supstance upotrebi vrednost log k'. Ukoliko konkretni rezultati pokažu da se log Koc ispitivane supstance nalazi izvan kalibracionog opsega, ispitivanje ponoviti koristeći druge primerenije referentne supstance.

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

- identitet ispitivane i referentnih supstanci i njihove hemijske čistoće i ukoliko je od značaja vrednosti pKa;

- opis opreme i uslova ispitivanja, tj. vrste i veličine analitičke (i zaštitne) kolone, načina detekcije, mobilne faze (odnos sastojaka i pH), temperaturnog opsega u toku merenja;

- "mrtvo vreme" i metoda kojom je određivano;

- količine ispitivane i referentnih supstanci ubrizganih u kolonu;

- retenciona vremena referentnih sastojaka korišćenih za kalibraciju;

- detalji o prilagođenoj regresionoj pravoj (logk' prema log Koc) i grafički prikaz regresione prave;

- prosečne podatke o retenciji i procenjen d log Koc vrednosti ispitivanih jedinjenja;

- hromatograme.

**3. LITERATURA**

1. W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed), (1990) Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2. J. Hodson, N.A. Williams, (1988) The estimation of the adsorption coefficient (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, p. 167.

3. G.G. Briggs, (1981) Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

4. C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding, (1983) Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, p. 227-231.

5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984) Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 297-312.

6. C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed, (1979) A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, p. 831-832.

7. S.W. Karickhoff, (1981) Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 833-846.

8. W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann, (1997) Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.

9. M. Mueller, W. Kördel (1996) Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

10. W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), p. 2341-2352.

11. B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991) Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, p. 285-304.

12. W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

**Deo drugi**

Tabela 1: Poređenje Koc vrednosti za zemljišta i kanalizacioni mulj i vrednosti dobijene HPLC metodom**XXIV, XXV**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Referentna supstanca | CAS br. | log Koc otpadne vode | log Koc | D | log Koc zemljišta | log Koc HPLC | D |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,66 | 2,14 | 0,48 | 1,81 | 2,20 | 0,39 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,43 | 2,96 | 0,53 | 2,59 | 2,89 | 0,30 |
| Fention | 55-38-9 | 3,75 | 3,58 | 0,17 | 3,31 | 3,40 | 0,09 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,46 | 2,21 | 0,75 | 1,99 | 2,26 | 0,27 |
| Fenantren | 85-01-8 | 4,35 | 3,72 | 0,63 | 4,09 | 3,52 | 0,57 |
| Fenilester benzoeve kiseline | 93-99-2 | 3,26 | 3,03 | 0,23 | 2,87 | 2,94 | 0,07 |
| Benzamid | 55-21-0 | 1,60 | 1,00 | 0,60 | 1,26 | 1,25 | 0,01 |
| 4-Nitrobenzamid | 619-80-7 | 1,52 | 1,49 | 0,03 | 1,93 | 1,66 | 0,27 |
| Acetanilid | 103-84-4 | 1,52 | 1,53 | 0,01 | 1,26 | 1,69 | 0,08 |
| Anilin | 62-53-3 | 1,74 | 1,47 | 0,27 | 2,07 | 1,64 | 0,43 |
| 2,5-Dikloranilin | 95-82-9 | 2,45 | 2,59 | 0,14 | 2,55 | 2.58 | 0,03 |

Tabela 2: Rezultati međulaboratorijskog poređenja (11 laboratorija) obavljenog u cilju poboljšanja i validacije HPLC-metode**XXVI**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Referentna supstanca | CAS-br. | log Koc | Koc | log Koc |
| (OECD 106) | (HPLC -metoda) | |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 78 ± 16 | 1,89 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,99 | 100 ± 8 | 2,00 |
| Triapentenol | 77608-88-3 | 2,37 | 292 ± 58 | 2,47 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 465 ± 62 | 2,67 |
| Fention | 55-38-9 | 3,31 | 2062 ± 648 | 3,31 |

Tabela 3: Preporučene referentne supstance za HPLC metodu na osnovu podataka o adsorpciji u zemljištu

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Referentna supstanca | CAS-br. | log Koc srednje vrednosti metode ravnotežnog stanja | Br. podataka o Koc | log S.D. | Izvor |
| acetanilid | 103-84-4 | 1,25 | 4 | 0,48 | **XXVII** |
| fenol | 108-95-2 | 1,32 | 4 | 0,70 | **XXV** |
| 2-nitrobenzamid | 610-15-1 | 1,45 | 3 | 0,90 | **XXVIII** |
| N,N-dimetilbenzamid | 611-74-5 | 1,52 | 2 | 0,45 | **XXV** |
| 4-metilbenzamid | 619-55-6 | 1,78 | 3 | 1,76 | **XXV** |
| metilbenzoat | 93-58-3 | 1,80 | 4 | 1,08 | **XXV** |
| atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 3 | 1,08 | **XXIX** |
| izoproturon | 34123-59-6 | 1,86 | 5 | 1,53 | **XXVII** |
| 3-nitrobenzamid | 645-09-0 | 1,95 | 3 | 1,31 | **XXVI** |
| anilin | 62-53-3 | 2,07 | 4 | 1,73 | **XXV** |
| 3,5-dinitrobenzamid | 121-81-3 | 2,31 | 3 | 1,27 | **XXV** |
| karbendazim | 10605-21-7 | 2,35 | 3 | 1,37 | **XXVII** |
| triadimenol | 55219-65-3 | 2,40 | 3 | 1,85 | **XXVII** |
| triazoksid | 72459-58-6 | 2,44 | 3 | 1,66 | **XXVII** |
| triazofos | 24017-47-8 | 2,55 | 3 | 1,78 | **XXVII** |
| linuron | 330-55-2 | 2,59 | 3 | 1,97 | **XXVII** |
| naftalen | 91-20-3 | 2,75 | 4 | 2,20 | **XXV** |
| endosulfan-diol | 2157-19-9 | 3,02 | 5 | 2,29 | **XXVII** |
| metiokarb | 2032-65-7 | 3,10 | 4 | 2,39 | **XXVII** |
| Acid Yellow 219 | 63405-85-6 | 3,16 | 4 | 2,83 | **XXV** |
| 1,2,3-trihlorobenzen | 87-61-6 | 3,16 | 4 | 1,40 | **XXV** |
| g-HCH | 58-89-9 | 3,23 | 5 | 2,94 | **XXV** |
| fention | 55-38-9 | 3,31 | 3 | 2,49 | **XXVII** |
| Direct Red 81 | 2610-11-9 | 3,43 | 4 | 2,68 | **XXV** |
| pirazofos | 13457-18-6 | 3,65 | 3 | 2,70 | **XXVII** |
| a-endosulfan | 959-98-8 | 4,09 | 5 | 3,74 | XXVII |
| diklofop-metil | 51338-27-3 | 4,20 | 3 | 3,77 | **XXVII** |
| fenantren | 85-01-8 | 4,09 | 4 | 3,83 | **XXV** |
| Basic Blue 41(smeša) | 26850-47-5  12270-13-2 | 4,89 | 4 | 4,46 | **XXV** |
| DDT | 50-29-3 | 5,63 | 1 | - | **XXVI** |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXIV** W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosp here, 35(1/2), 121-128.  
**XXV** W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.  
**XXVI** W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.  
**XXVII** W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC.UBA R & D Report No.106 01 044 (1994).   
**XXVIII** B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein., (1991) Chemosphere, 22, p. 285-304.  
**XXIX** Podatke dostavlja industrija.

**C.20. METODA ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU VRSTE *Daphnia magna***

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 211 (1998).

*1.1. UVOD*

Osnovni cilj metode ispitivanja je procena uticaja hemikalija na reprodukciju Daphnia magna.

*1.2. DEFINICIJE I MERNE JEDINICE*

Ispitivane jedinke jesu ženke dafnije koje su na početku ispitivanja u stadijumu neonate i kod kojih se ispituje sposobnost stvaranja potomstva.

Potomstvo jesu mlade dafnije nastale partenogenezom ispitivanih jedinki u toku trajanja ispitivanja.

Najniža efektivna koncentracija (Lowest Observed Effect Contrencation, u daljem tekstu: LOEC) jeste najniža koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do statistički značajnih promena na nivou razmnožavanja i preživljavanja ispitivanog organizama (pri *p* < 0,05) u poređenju sa kontrolom unutar navedenog perioda izloženosti. Sve ispitivane koncentracije iznad LOEC imaju štetan uticaj, jednak ili veći od onih primećenih kod LOEC. Kada se ne mogu zadovoljiti ova dva uslova, daje se detaljno objašnjenje na koji je način izabrana LOEC (a time i NOEC).

Koncentracija bez uočenog efekta (No Observed Effect Contrencation, u daljem tekstu: NOEC) jeste najviša ispitivana koncentracija, a prva ispod LOEC, koja u poređenju sa kontrolom ne dovodi do statistički značajne promene (*p* < 0,05) posmatranog parametra unutar navedenog perioda izloženosti.

ECx je koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi koja rezultira sa x posto smanjenja reprodukcije *Daphnia magna* unutar naznačenog perioda izloženosti.

Stvarna brzina rasta je mera rasta populacije koja objedinjuje sposobnost razmnožavanja i smrtnost specifičnu za određenu starost. Ako je populacija u ravnotežnom stanju stvarna brzina rasta biće nula. Za rastuće populacije stvarna brzina rasta biće pozitivna, a za populaciju koja se smanjuje biće negativna i dovešće do njenog izumiranja.

Granica detekcije jeste najniža koncentracija koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati.

Granica određivanja jeste najniža koncentracija koja se može kvantitativno odrediti.

Mortalitet životinja jeste slučaj kada se jedinka smatra uginulomjer je nepokretna, tj. kada ne može da zapliva, ili kada nema vidljivih pokreta ekstremiteta ili postabdomenani 15 sekundi nakon pažljivog protresanja posude za ispitivanje.**XXX**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXX** Upotreba drugih definicija se obrazlaže uz navode odgovarajuće literature.

*1.3. PRINCIP METODE*

Mlade ženke dafnija (ispitivane jedinke - neonate) stare manje od 24 sata na početku ispitivanja, izlažu se ispitivanoj supstanci koja se dodaje u vodu u određenom opsegu koncentracija. Dužina ispitivanja je 21 dan. Na kraju ispitivanja određuje se ukupan broj preživelog potomstva koje je dobijeno partenogenezom jedinki koje su preživele ispitivanje. Ne broji se potomstvo ispitivanih jedinki koje su u uginule u toku studije. To znači da se ne broji potomstvo ispitivanih jedinki koje su, u međuvremenu, uginule. Sposobnost razmnožavanja ispitivanih jedinki se može izraziti i na druge načine (npr. kao živo potomstvo po ispitivanoj jedinki na određeni dan, od prvog dana kad se uoče prvi potomci), ali bi se o njima trebalo izvestiti zajedno sa ukupnim brojem potomstva po živoj ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja. Sposobnost razmnožavanja životinja izloženih ispitivanoj supstanci poredi se sa kontrolama da bi se odredili LOEC i NOEC. Podaci se analiziraju pomoću regresionog modela kako bi se odredila koncentracija koja dovodi do smanjenja sposobnosti reprodukcije za x% (tj. EC50, EC20 ili EC10).

Navode se i podaci o preživljavanju ispitivanih jedinki i o vremenu potrebnom za stvaranje prve generacije potomaka. Mogu se utvrditi i ostala dejstva ispitivane supstance na parametre kao što su rast (dužina) i ako je moguće stvarna brzina rasta.

*1.4. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Treba imati rezultate ispitivanja akutne toksičnosti (videti Deo drugi metode C.2. koja je data u ovom prilogu) izvedenog sa vrstom *Daphnia magna*. Rezultat može biti koristan pri izboru odgovarajućeg opsega ispitivanih koncentracija kod ispitivanja toksičnosti po reprodukciju. Rastvorljivost u vodi i napon para ispitivane supstance potrebno je da budu poznati i da bude dostupna pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju supstance u rastvorima sa naznačenim vrednostima efikasnosti analitičke metode i granice određivanja.

Među podatke o ispitivanoj supstanci koji bi mogli biti korisni u određivanju ispitivanih uslova ubrajaju se strukturna formula, čistoća supstance, stabilnost na svetlu, stabilnost u uslovima ispitivanja, pKa, Pow i rezultati ispitivanja biorazgradivosti (videti metodu C.4. koja je data u ovom prilogu).

*1.5. PRIHVATLJIVOST METODE*

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, ispunjavaju se kriterijumi kvaliteta u kontrolama:

- smrtnost ispitivanih jedinki (ženke dafnija) ne prelazi 20% na kraju ispitivanja;

- prosečan broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja je ≥ 60.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Aparatura**

Posude za ispitivanje i ostala aparatura koja dolazi u kontakt sa ispitivanim rastvorima su isključivo od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Posude za ispitivanje su najčešće staklene čaše.

Dodatno su potrebni:

- oksimetar (s mikroelektrodama ili drugom prikladnom opremom za merenje rastvorenog kiseonika u uzorcima male zapremine);

- adekvatna oprema za kontrolu temperature;

- pH metar;

- oprema za određivanje tvrdoće vode;

- oprema za određivanje TOC u vodi ili oprema za određivanje HPK;

- adekvatna aparatura za kontrolu svetlosnog režima i merenje jačine svetlosti.

**1.6.2. Ispitivani organizmi**

Vrsta koje se koristi u metodi ispitivanja je *Daphnia magna* Straus. Druge vrste roda *Daphnia* se mogu koristiti ako zadovoljavaju kriterijume prihvatljivosti (za korišćenje vrsta roda *Daphnia* merodavan kriterijum prihvatljivosti je sposobnost razmnožavanja u kontrolnim uslovima koji vredi za vrste roda *Daphnia*). Ako se koriste druge vrste roda *Daphniato* jasno se definiše i opravdava njihova upotreba.

Najbolje je da se klon odredi genotipizacijom. Istraživanja**1** su pokazala da reproduktivni potencijal Klona A3 konzistentno odgovara kriterijumu prihvatljivosti srednje vrednosti od 3 60 neonata po preživeloj jedinki, uzgajanoj u uslovima opisanim u ovoj metodi. Prihvatljivi su i drugi klonovi, pod uslovom da kultura dafnija zadovoljava kriterijume prihvatljivosti.

Na početku ispitivanja, životinje moraju biti stare manje od 24 sata (tzv. neonate) i ne bi smele biti prva generacija potomstva. One treba da potiču iz zdrave matične linije (odnosno bez znakova stresa kao što su visoka smrtnost, prisustvo mužjaka i zimskih jaja (ephippia), kašnjenje u pojavi prve generacije potomstva, depigmentisane životinje, itd.). Matična linija životinja se održava u konstantnim laboratorijskim uslovima (svetlo, temperatura, medijum, ishrana i broj jedinki po jedinici zapremine) koji su slični onima u ispitivanju. Ako se medijum sa kulturom dafnija koji se koristi u ispitivanju razlikuje od rutinske kulture dafnija, poželjno je omogućiti period aklimatizacije pre ispitivanja od obično 3 nedelje (koliko je potrebno da se dobije jedna generacija životinja) da bi se izbegao stres za ispitivanih jedinki.

**1.6.3. Medijum**

Preporučuje se upotreba potpuno definisanog medijuma. Time se izbegava upotreba aditiva (npr. morska trava, ekstrakt zemljišta, itd.) koje je teško okarakterisati i unapređuje se međulaboratorijska standardizacija. Elandt medijumi M4 i M7 (videti Deo drugi ove metode) smatraju se prikladnima u ove svrhe. Prihvatljivi su i drugi medijijumi**5,6** pod uslovom da se pokaže da kultura dafnija zadovoljava kriterijume prihvatljivosti ispitivanja.

Ako se koriste medijumi sa nedefinisanim aditivima, te aditive navesti i u izveštaju o ispitivanju izneti podatke o sastavu medijuma, naročito s obzirom na sadržaj ugljenika, jer to može uticati na hranu kojom se životinje hrane. Preporučuje se da se odredi TOC, odnosno HPK u medijumu matične linije i da se proceni njihov udeo u TOC/HPK medijuma u kojem će se izvesti. Preporučuje se da sadržaj TOC u medijumu (pre dodavanja algi) bude manji od 3 mg/l2.

Pri ispitivanju supstanci koje sadrže metale, važno je imati na umu da sastav medijuma (npr. tvrdoća, nagradnja helata) može uticati na procenu toksičnosti ispitivane supstance. Poželjno je da medijum bude potpuno definisan. Za sada se od sasvim definisanih medijuma prikladnih za održavanje vrste *Daphnia magna* u dugotrajnoj kulturi, zna samo za Elandt medijume M4 i M7. Oba medijuma sadrže helatizirajuće jedinjenje EDTA. Pokazalo**2** se da je "prividna toksičnost" kadmijuma generalno niža kada se u ispitivanju toksičnosti po reprodukciju koriste medijumi M4 ili M7 umesto medijuma koji ne sadrže EDTA. Stoga se korišćenje M4 ni M7 ne preporučuje za ispitivanje supstanci koje sadrže metale, a izbegavati i ostale medijume za koje se zna da sadrže helatizirajuća jedinjenja. Za ispitivanje supstanci koje sadrže metale bilo bi preporučljivo koristiti alternativne medijume, poput, npr. tvrde vode rekonstituisane prema ASTM**7**, koja ne sadrži EDTA i kojoj se dodaje ekstrakt morskih algi**8**. Ta kombinacija tvrde vode pripremljene prema ASTM i ekstrakta morskih algi prikladna je i za održavanje vrste *Daphnia magna***2** u dugotrajnoj kulturi, premda još uvek ima slabu helatizirajuću aktivnost zbog organskih sastojaka dodatog ekstrakta morskih algi.

Na početku i u toku ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika je iznad 3 mg/l. Vrednost pH je potrebno da bude u opsegu od 6 do 9 i u normalnim okolnostima ne sme da koleba za više od 1,5 jedinice ni u jednom testu. Preporučuje se tvrdoća veća od 140 mg/l (kao CaCO3). Testovi izvedeni pri toj ili većim koncentracijama pokazali su da je sposobnost razmnožavanja u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti**9,10**.

**1.6.4. Test rastvori**

Test rastvori izabranih koncentracija pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovne rastvore pripremati rastvaranjem supstance u test mediju.

U nekim slučajevima može se ukazati potreba za korišćenjem organskih rastvarača ili disperzionih sredstava, kako bi se pripremio osnovni rastvor željene koncentracije. Upotrebu navedenih materijala, ukoliko je moguće, izbegavati. Prikladni rastvarači su: aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. Prikladna disperziona sredstva su: Cremophor RH40, 0,01% metilceluloza i HCO-40. Koncentracija ispitivane supstance u rastvoru ne sme da bude veća od granične rastvorljivosti te supstance u medijumu.

Rastvarači se koriste za pripremu osnovnog rastvora koji će moći precizno da se dozira. Pri preporučenim koncentracijama rastvarača u konačnom medijumu (≤ 0,1 ml/l) navedeni rastvarači ne deluju toksično i ne povećavaju rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

Disperziona sredstva mogu omogućiti precizno doziranje i disperziju. Pri preporučenim koncentracijama u konačnom, medijumu (≤ 0,1 ml/l) navedena disperziona sredstva ne deluju toksično i ne povećavaju rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

*1.7. POSTAVKA ISPITIVANJA*

Tretmani (koncentracije) raspoređuju se po posudama za ispitivanje po slučajnom rasporedu. U suprotnom, moguće je dobiti neobjektive rezultate koji se pogrešno mogu pripisati razlikama u koncentraciji ispitivane supstance. Ako se ekperimentalni postupci izvode u stalnom redosledu od niže prema višoj koncentraciji, moguća je pojava određenih vremenski-zavisnih efekata poput zamora lica koje vrši ispitivanje ili neke druge greške, što može dovesti do prividnog pojačanja efekta ispitivane supstance u tretmanima sa višim koncentracijama. Ako postoji mogućnost da rezultati ispitivanja zavise od početnih uslova ili uslova okoline, npr. od mesta u laboratoriji, razmotriti mogućnost ispitivanja u blok-sistemu.

*1.8. POSTUPAK*

**1.8.1. Uslovi pri izlaganju**

*1.8.1.1. Dužina ispitivanja*

Ispitivanje traje 21 dan.

*1.8.1.2. Gustina nasada ispitivanih jedinki*

Ispitivane jedinke drže se odvojeno, po jedna u svakoj ispitivanoj posudi, u 50 ml do 100 ml medijuma u svakoj posudi. Ponekad su potrebne veće zapremine, da bi se zadovoljili zahtevi analitičkog postupka koji se koristi za određivanje koncentracije ispitivane supstance, a dopušteno je i objedinjavanje uzoraka iz više posuda za ispitivanje istog tretmana potrebnih za hemijsku analizu. Ako se koriste zapremine veće od 100 ml, dozvoljeno je povećati količinu hrane koja se daje dafnijama da bi se obezbedila adekvatna dostupnost hrane i da bi se zadovoljili kriterijumi kvaliteta. Kod ispitivanja u protočnim uslovima, postavka može, zbog tehničkih razloga, biti i drugačija (npr. četiri grupe po 10 jedinki, u ispitivanim posudama u većoj zapremini), ali sve izmene u postavci navesti u izveštaju.

*1.8.1.3. Broj jedinki*

Za ispitivanja u polustatičnom sistemu, potrebno je najmanje 10 jedinki po tretmanu (koncentraciji) postavljenih pojedinačno u ispitivanoj posudi i isto toliko u kontrolnom tretmanu.

Kod ispitivanja u protočnim uslovima pokazala se zadovoljavajućom postavka sa 40 jedinki podeljenih u četiri grupe po 10 jedinki za svaki tretman (koncentraciju ispitivane supstance)**1**. Može se raditi i sa manjim brojem životinja, ali se preporučuje najmanje 20 životinja po koncentraciji, podeljenih u dve ili više paralelnih grupa (replika, kopija) sa jednakim brojem životinja u svakoj grupi (npr. po četiri replike sa po pet dafnija u svakoj). Pri postavci sa više od jedne dafnije po posudi za ispitivanje, nije moguće reprodukciju izraziti kao ukupni broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki preživeloj do kraja ispitivanja, ako jedinka ugine pre kraja ispitivanja. U takvim slučajevima reprodukciju izraziti kao ukupni broj živih potomaka dobijen od ispitivanih jedinki prisutnih sa početka ispitivanja.

*1.8.1.4. Ishrana*

Pri postavci u polustatičnom sistemu, jedinke je poželjno hraniti svaki dan, a najmanje tri puta nedeljno (tj. pri promeni medijuma). Ako se odstupi od ovakvog režima ishrane (npr. kod postavke u protočnim uslovima), to navesti u izveštaju o ispitivanju.

Tokom trajanja ispitivanja, ispitivane jedinke hraniti živim algama jedne ili više vrsta: vrste roda *Chlorella, Selenastrum capricornutum* (sada *Pseudokirchneriella subcapitata***11**) i *Scenedesmus subspicatus*. Količinu hrane odrediti prema količini organskog ugljenika (C) potrebnog svakoj ispitivanoj jedinki. Istraživanja**12** su pokazala da je za održavanje vrste *Daphnia magna* dovoljna koncentracija od 0,1 do 0,2 g/C/jedinki/dan, da bi se dobio broj potomaka potreban u skladu sa kriterijuma za prihvatljivost rezultata ispitivanja. Hranu davati ili u stalnoj količini u toku trajanja ispitivanja ili po želji, na početku davati manje količine, a potom u toku ispitivanja kako ispitivane jedinke rastu količinu postepeno povećavati. Količina hrane se kreće u preporučenom opsegu od 0,1 do 0,2 g/C/individue/dan.

Ako se za izračunavanje količine potrebne hrane koriste alternativni pokazatelji, kao što je broj algalnih ćelija ili absorbanca (radi lakše procene, jer je merenje sadržaja ugljenika zahtevna dugotrajna metoda), svaka laboratorija pravi sopstveni nomogram procene sadržaja ugljenika u algama na osnovu alternativnih pokazatelja (za preporuke o izradi nomograma videti Deo treći ove metode). Nomogrami se proveravaju najmanje jednom godišnje ili češće, ako su se promenili uslovi u kulturama algi. Apsorbancija se pokazala boljim alternativnim pokazateljem sadržaja ugljenika nego broj ćelija**13**.

Dafnije hraniti koncentrovanom suspenzijom algi, kako bi količina medijuma za algalne kulture koja će se dodati medijumu svela na minimum. Suspenzija algi se može napraviti centrifugiranjem i ponovnim resuspendiranjem u destilovanoj vodi, dejonizovanoj vodi ili u mediju za gajenje dafnija.

*1.8.1.5. Svetlosni režim*

16 sati svetla jačine koja ne prelazi 15-20 mE/m2c-1.

*1.8.1.6. Temperatura*

Temperatura medijuma u kojem se izvodi ispitivanje je u opsegu od 18° C do 22° C. Bez obzira na vrstu ispitivanja, temperatura unutar opsega ne varira za više od 2° C (npr. da je 18° C do 20° C, 19° C do 21° C ili 20° C do 22° C). Može se pokazati prikladnim pripremiti dodatnu posudu za ispitivanje sa medijumom za praćenje temperature.

*1.8.1.7. Aeracija*

Posude za ispitivanje se ne aerišu u toku ispitivanja.

**1.8.2. Koncentracija ispitivane supstance**

Uobičajeno je da se ispitivanje izvodi u najmanje 5 koncentracija ispitivane supstance u geometrijskoj seriji koncentracija, raspoređenim sa faktorom ne većim od 3,2 i u potrebnom broju ponavljanja (replika) po tretmanu (videti odeljak 1.8.1.3. ove metode). Ako se ispitivanje izvodi sa manje od pet koncentracija, obrazložiti razloge. Supstance ne ispitivati u koncentracijama višim od njihove rastvorljivosti u medijumu.

Pri određivanju opsega koncentracija voditi računa o:

- ako je cilj dobijanje vrednosti LOEC/NOEC, najniža ispitivana koncentracija je dovoljno niska, tako da fekundidet pri toj koncentraciji ne bude statistički značajno niži od one u kontrolama. U slučaju drugačijeg odgovora, ispitivanje ponoviti sa sniženom najnižom ispitivanom koncentracijom;

- ako je cilj dobijanje vrednosti LOEC/NOEC, najviša ispitivana koncentracija je dovoljno visoka, tako da fekunditet pri toj koncentraciji bude statistički značajno niži nego u kontrolnim uslovima. U slučaju drugačijeg odgovora, ispitivanje ponoviti sa višom najvišom ispitivanom koncentracijom;

- ako se određuje ECx, efektivna koncentracija koja utiče na sposobnost razmnožavanja, preporučljivo je primeniti dovoljan opseg koncentracija, kako bi se ECx odredila sa zadovoljavajućim intervalima poverenja. Ako se određuje EC50, efektivna koncentracija za sposobnost razmnožavanja, preporučljivo je da najviša primenjena koncentracija bude veća od EC50. U suprotnom će, iako će EC50 moći da se odredi, interval poverenja za EC50 biti veoma širok i možda neće biti moguće na zadovoljavajući način oceniti adekvatnost izabranog modela;

- nastojati da se u seriju ispitivanih koncentracija ne uključi nijedna koja ima statistički značajno dejstvo na preživljavanje odraslih životinja, jer bi se time promenila priroda ispitivanja; to više ne bi bilo samo ispitivanje toksičnosti po reprodukciju, već kombinovano ispitivanje toksičnosti po reprodukciju i smrtnost, pa bi i statistička analiza dobijenih rezultata bila mnogo složenija.

Prethodno poznavanje toksičnosti ispitivane supstance (npr. rezultati ispitivanja akutne toksičnosti, odnosno rezultati preliminarnog ispitivanja postavljenog u cilju određivanja opsega ispitivanih koncentracija) mogu pomoći pri izboru adekvatne serije adekvatnog opsega ispitivanih koncentracija.

U slučajevima kada se za pripremu ispitivanih rastvora koristi rastvarač ili disperziono sredstvo (videti odeljak 1.6.4. ove metode), njegova finalna koncentracija u ispitivanim posudama ne sme biti veća od 0,1 ml/l i je jednaka u svim posudama.

**1.8.3. Kontrole**

Pri svakom ispitivanju postaviti jednu kontrolu sa medijumom i ukoliko je potrebno, jednu seriju kontrola sa rastvaračem ili disperzionim sredstvom. Kada se koristi rastvarač ili disperziono sredstvo, njegova koncentracija u kontrolnom medijumu je jednaka onoj u ispitivanim posudama sa ispitivanom supstancom. Pripremiti potreban broj replika (paralelnih uzoraka, kopija) (videti odeljak 1.8.1.3. ove metode).

Pri dobro izvedenom ispitivanju, koeficijent varijacije broja živih potomaka dobijenih od ispitivanih jedinki u kontrolnim grupama iznosi £ 25%, i to navesti u izveštaju o ispitivanju kada se ispitivanje izvodi sa po jednom jedinkom u svakoj ispitivanoj posudi.

**1.8.4. Promena ispitivanog medijuma**

Dinamika promene ispitivanog medijuma zavisi od stabilnosti supstance koja se ispituje, ali medijum menjati najmanje tri puta nedeljno. Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti (videti odeljak 1.4. ove metode) pokaže da koncentracija ispitivane supstance nije stabilna, t.j. da je izvan nominalnog opsega od 80% do 120% ili da iznosi manje od 80% početne koncentracije u toku najdužeg perioda u kome se menja medijum - tri dana, razmotriti mogućnost češće promene medijuma, ili ispitivanje u protočnim uslovima.

Kada se medijum menja u toku ispitivanja u semistatičkim uslovima, pripremiti još jednu seriju posuda za ispitivanje i u njih prebaciti ispitivane jedinke, npr. pomoću staklenih pipeta adekvatnog promera. Treba paziti da se pritom u novu posudu sa dafnijom prebaci što manje medijuma.

**1.8.5. Posmatranje**

Rezultate posmatranja beležiti u odgovarajuće obrasce (za primere videti Deo četvrti i peti ove metode). Ako su potrebna i druga merenja (videti odeljak 1.3. i 1.8.8. ove metode), može se pokazati potrebnim i dodatno promatranje.

**1.8.6. Potomstvo**

Potomstvo svake ispitivane jedinke, ako je moguće, svakodnevno odvajati i brojati, od pojave prve generacije potomaka, kako bi se izbeglo da potomstvo troši hranu namenjenu roditeljskim jedinkama. Za potrebe ove metode broje se samo živi potomci, no može se beležiti i prisustvo abortiranih jaja i uginulih potomaka.

**1.8.7. Mortalitet**

Smrtnost među ispitivanim jedinkama prati se svakodnevno ili najmanje onoliko često koliko se broje i dobijeni potomci.

**1.8.8. Ostali parametri**

Iako je ova metoda namenjena prvenstveno proceni dejstva supstanci na reprodukcioni potencijal, njome se mogu određivati kvantitativno i drugi efekti, u dovoljnoj meri da to omogući statističku analizu. Poželjno je pratiti rast, jer se time dobija podatak o mogućim subletalnim efektima koji može biti korisniji od samog merenja sposobnosti reprodukcije. Preporučuje se i merenje dužine ispitivanih jedinki (t.j. dužine tela bez analnog nastavka) na kraju ispitivanja. Među ostale pokazatelje koji se mogu meriti ili izračunati ubrajaju se vreme potrebno za pojavu prve generacije potomaka (i idućih generacija), broj i veličina legla po životinji, broj odbačenih legla, prisutnost mužjaka ili efipija, kao i stvarna stopa rasta populacije.

**1.8.9. Učestalost analitičkih određivanja i merenja**

Koncentraciju kiseonika, temperaturu, tvrdoću i pH vrednost meriti najmanje jednom nedeljno, u svežem i starom medijumu i to u kontrolama i u medijumu sa najvišom koncentracijom ispitivane supstance.

Tokom ispitivanja se u pravilnim vremenskim intervalima meri i koncentracija ispitivane supstance.

Pri ispitivanju u polustatičnom sistemu, kod kojih se očekuje da koncentracije ispitivane supstance ne variraju za više od ± 20% od nominalnih vrednosti (t.j. da se kreću u opsegu 80% do 120% - videti odeljak 1.4 i 1.8.4. ove metode), preporučuje se da se analiziraju barem najviša i najniža ispitivana koncentracija i to pri pripremi svežeg medijuma i jednom nedeljno u toku ispitivanja, promeni medijuma (t.j. analizu obaviti u uzorku iste koncentracije, pri pripremi te koncentracije i pri promeni medijuma). Ta određivanja ponavljati u intervalima od najmanje jednom nedeljno.

Pri ispitivanjima kod kojih se očekuje da koncentracije ispitivane supstance variraju za više ± 20% od nominalnih vrednosti, neophodno je analizirati sve ispitivane koncentracije, pri njihovoj pripremi i pri promeni medijuma. Kod ispitivanja kod kojih merenje početne koncentracije ispitivane supstance pokaže da ona nije unutar opsega od ± 20% nominalne vrednosti, ali ima dovoljno dokaza da se te početne koncentracije mogu ponavljati i da su stabilne (tj. da se kreću u opsegu 80% do 120% od početnih), hemijska određivanja u 2. i 3. nedelji ispitivanja mogu da se ograniče na proveru najniže i najviše koncentracije. U svakom slučaju, koncentraciju ispitivane supstance pre promene medijuma proveriti samo u jednoj od replika (paralelnih uzoraka) za svaku od koncentracija.

Ako se ispitivanje sprovodi u protočnom sistemu, primeren je sličan režim uzimanja uzorka kao i u polustatičnom sistemu (osim što se u tom slučaju ne može meriti koncentracija supstance u ranijim uzorcima). Od koristi je da se poveća broj uzoraka uzetih u toku prve nedelje ispitivanja, odnosno da se obavljaju tri kompleta merenja kako bi se osiguralo da koncentracije ostanu stabilne. Pri ispitivanjima u protočnom sistemu svakodnevno proveravati brzinu protoka medijuma i ispitivane supstance.

Ako se dokaže da se koncentracija ispitivane supstance u toku ispitivanja održava unutar zadovoljavajućeg opsega od ± 20% od nominalne vrednosti ili vrednosti izmerene na početku ispitivanja, rezultati se mogu zasnivati na nominalnoj ili na izmerenoj početnoj vrednosti. Ako odstupanja od nominalne ili početne izmerene vrednosti prelaze ± 20%, rezultate izraziti u terminima srednje vrednosti u funkciji vremena (videti Deo šesti ove metode).

**2. PODACI I IZVEŠTAJ**

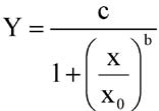
*2.1. OBRADA REZULTATA*

Cilj ove metode ispitivanja je određivanje uticaja ispitivane supstance na ukupni broj živih potomaka dobijenih po živoj ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja. Ukupni broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki izračunati za svaku posudu za ispitivanje (tj. za svaku repliku ili paralelni uzorak). Uzorak u kojem je ispitivana jedinka u toku ispitivanja uginula ili se pokaže da je ispitivana jedinka bila mužjak, isključiti iz analize. U tom slučaju će se analiza zasnivati na smanjenom broju replika.

Kada se, u sklopu procene uticaja hemikalije na sposobnost reprodukcije određuje LOEC, a time i NOEC, potrebno je izračunati srednju vrednost reprodukcije za sve replike pri određenoj koncentraciji, kao i rezidualnu standardnu devijaciju, što se može učiniti analizom varijanse (u daljem tekstu: ANOVA). Srednja vrednost dobijena za svaku koncentraciju poredi se sa srednjom vrednošću kontrolnog tretmana, služeći se adekvatnom, statističkom metodom za višestruka poređenja. Ispitivanja koja u ovu svrhu mogu biti od koristi data su u literaturi**14,15,16,17**. Neophodno je proveriti da li vredi ANOVA pretpostavka o homogenosti varijanse. Preporučuje se da se to učini grafički, a ne formalnim izračunavanjem statističke značajnosti**18**. Alternativno, može poslužiti i Bartletov test. Ako pretpostavka ne vredi, tada pre izvođenja ANOVA razmotriti mogućnost transformacije podataka radi homogenizovanja varijanse ili umesto ANOVA izvesti pondiranu ANOVA. Izračunati i navesti i osetljivost ANOVA (najmanju statistički značajnu razliku).

Za određivanje EC50 iz dobijenih rezultata izračunati odgovarajuću krivu, npr. logističku krivu, služeći se adekvatnom statističkom metodom, npr. metodom najmanjih kvadrata. Kriva se može parametrizovati, tako da se EC50 i njena standardna greška mogu direktno odrediti. Time se znatno olakšava izračunavanje intervala poverenja za EC50. Navesti dvostrani 95%-tni interval poverenja, osim ako ne postoje dobri razlozi da se prednost da nekom drugom nivou pouzdanosti. Postupak uklapanja krive obezbeđuje i način za ocenu statističkog značaja izostanka podudarnosti sa krivom. To se može učiniti grafički ili deljenjem ostatka sume kvadrata u kategoriju "nedostatak podudarnosti" (lack of fit) i u kategoriju "komponente čiste greške" (pure error components) i testom statističkog značaja za nedostatak podudarnosti. Budući da u tretmanima sa visokim fekunditetom postoji tendencija veće varijanse u broju potomstva nego u tretmanima sa niskim fekunditetom, pa je potrebno razmotriti i mogućnost pondiranja dobijenih vrednosti, kako bi se uvažila različitost varijansi između tretmana (videti u literaturi**18**).

Pri analizi podataka dobijenih u međulaboratorijskoj proveri**2**, logistička kriva je izračunata pomoću sledećeg modela, iako se koriste i drugi adekvatni modeli:



pri čemu:

Y jeste ukupni broj potomaka po živoj roditeljskoj životinji na kraju ispitivanja (izračunato za svaku ispitivanu posudu);

*x* jeste koncentracija ispitivane supstance;

*c* jeste očekivani broj potomaka kada je x = 0;

*x*0 jeste EC50 u populaciji;

*b* jeste nagib krive.

Ovaj model je najverovatnije prikladan za veći broj situacija, ali ima i situacija za koje neće odgovarati. Zato proveriti valjanost modela, kao što je gore navedeno. U nekim slučajevima mogao bi da odgovara hormezis model u kom niske koncentracije imaju pojačano dejstvo.

Mogu se proceniti i druge efektivne koncentracije, npr. EC10 ili EC20, iako u tom slučaju prednost a dati drugačijoj parametrizaciji modela od one koja se koristila za procenu EC50.

*2.2. IZVEŠTAJ*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- priroda supstance i merodavna fizičko-hemijska svojstva,

- podaci o identifikaciji hemikalije, uključujući čistoću;

2) ispitivanoj vrsti:

- klon (genotipiziran ili ne), dobavljač ili izvor (ako je poznat) i uslovi gajenja kulture. Ako se ne koristi vrstan *Daphnia magna*, navodi se obrazloženje;

3) uslovima ispitivanja:

- korišćeni postupak (npr. semistatični ili protočni sistem, zapremina, broj dafnija po litri),

- fotoperiod i jačina svetla,

- postavka ispitivanja (npr. broj replika, broj roditeljskih jedinki po replici),

- detalji o korišćenom mediju za gajenje kulture,

- podaci o organskom materijalu, ako je korišćen, uključujući podatke o sastavu, izvoru, metodi pripreme, TOS/HPK osnovnog rastvora, vrednosti TOS/HPK izmerene u medijumu,

- detaljne podatke o ishrani, uključujući količinu hrane u mg/C/Dafnija/dan) i režim (npr. vrsta hrane - ako je reč o algama, navesti tačno ime vrste i ako je poznato, navesti soj i uslove gajenja u kulturi),

- metode pripreme osnovnih rastvora i dinamiku izmene (navesti rastvarač ili disperziono sredstvo, ako je korišćeno);

4) rezultatima:

- rezultati bilo kakvih preliminarnih studija o stabilnosti ispitivane supstance,

- nominalna koncentracija i rezultati svih merenja koncentracije ispitivane supstance u ispitivanim posudama (videti primer obrasca u Delu petom ove metode), podaci o efikasnosti analitičke metode i granicama detekcije,

- kvalitet vode u ispitivanim posudama, tj. podaci o pH, temperaturi i koncentraciji rastvorenog kiseonika, podaci o TOS, odnosno HPK i tvrdoći (videti primer obrasca u Delu četvrtom ove metode);

- potpuni podaci o potomstvu dobijenom od svake roditeljske jedinke (videti primer obrasca u Delu četvrtom ove metode);

- broj uginulih roditeljskih jedinki i dan kada su uginule (videti primer obrasca u Delu četvrtom ove metode);

- koeficijent varijacije fekunditeta u kontrolnim grupama (zasniva sena ukupnom broju živih potomaka po živoj roditeljskoj jedinki na kraju ispitivanja);

- grafički prikaz zavisnosti ukupnog broja živih potomaka po živoj roditeljskoj jedinki (za svaku repliku) na kraju ispitivanja nasuprot koncentraciji ispitivane supstance;

- LOEC po reprodukciju, uključujući opis primenjenih statističkih postupaka i naznaka o najnižoj statistički značajnoj razlici koja se može detektovati, kao i ako je primenljivo, podatak o najvišoj ispitivanoj koncentraciji koja ne dovodi do NOEC. Navesti i podatak o LOEC/NOEC za smrtnost roditeljskih jedinki;

- gde je prikladno, navesti ECx za reprodukciju, intervale poverenja i grafički prikaz modela upotrebljenog za njihovo izračunavanje, nagib krive dozne zavisnosti i njegovu standardnu grešku;

- ostali uočeni biološki efekti i merenja - navesti podatke o svim ostalim biološkim efektima koji su uočeni ili izmereni (npr. rast roditeljskih jedinki), uključujući odgovarajuće obrazloženje;

- obrazloženje za svako odstupanje od metode ispitivanja.

**3. LITERATURA**

1. OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

2. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

3. Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991) A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, p. 257-265.

4. Elendt B.P., (1990) Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33.

5. EPA (1993) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

6. Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, p. 775-782.

7. ASTM (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. p. 20.

8. Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P., (1989) The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) p. 144-148.

9. Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P., (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, p. 1-8.

10. Cowgill U.M. and Milazzo D.P., (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), p. 185-196.

11. Korshikov (1990) *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, p. 209.

12. Sims I.R., Watson S. and Holmes D., (1993) Toward a standard *Daphnia juvenile* production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, p. 2053-2058.

13. Sims I., (1993) Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

14. Dunnett C.W., (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

15. Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 482-491.

16. Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, p. 103-117.

17. Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, p. 510-531.

18. Draper N.R. and Smith H., (1981) Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

19. Brain P. and Cousens R., (1989) An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, p. 93-96.

20. Wilson E.O. and Bossert, W.H., (1971) A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

**Deo drugi**

**PRIPREMA POTPUNO DEFINISANIH MEDIJUMA Elandt M7 I M4**

Aklimatizacija na medijume Elandt M7 i M4

Neke laboratorije su imale poteškoća pri direktnom premeštanju dafnija u medijume M4**1** i M7. Određen uspeh je postignut postupnom aklimatizacijom, odnosno premeštanjem životinja iz prirodnog medijuma u 30%, potom 60% i na kraju 100% Elandt. Aklimatizacioni period može potrajati i mesec dana.

PRIPREMA

Elementi u tragovima

Prvo se pripremaju odvojeni osnovni rastvori (I) svakog pojedinog elemenata u tragovima u vodi odgovarajuće čistoće, npr. dejonizovanoj, destilovanoj ili vodom dobijenom reverznom osmozom. Iz tih različitih osnovnih rastvora (II) priprema se jedan rastvor (II) koji sadrži sve elemente u tragovima (kombinovani rastvor), npr:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Osnovni rastvori I  (pojedinačne  supstance) | Količina koja se dodaje u vodu (mg/l) | Koncentracija (u poređenju sa medijumom M4) puta | Za pripremanje kombinovanog rastvora II - dodati sledeću količinu osnovnog rastvora I u vodu (ml/l) | |
| M 4 | M 7 |
| H3BO3 | 57.190 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| MnCl2Í 4H2O | 7.210 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6.120 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| RbCl | 1.420 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| SrCl2Í 6H2O | 3.040 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| Na2MoO4Í2H2O | 1.260 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| CuCl2Í2H2O | 335 | 20.000 | 1,0 | 0,25 |
| ZnCl2 | 260 | 20.000 | 1,0 | 1,0 |
| CoCl2Í 6H2O | 200 | 20.000 | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20.000 | 1,0 | 1,0 |
| Na2SeO3 | 43,8 | 20.000 | 1,0 | 1,0 |
| NH4VO3 | 11,5 | 20.000 | 1,0 | 1,0 |
| Na2EDTA Í 2H2O | 5.000 | 2.000 | - | - |
| FeSO4Í 7H2O | 1.991 | 2.000 | - | - |
| Rastvori Na2EDTA i FeSO4 se pripremaju odvojeno, spoje i odmah autoklaviraju. To daje: | | | | |
| 21 Fe-EDTA Rastvor |  | 1.000 puta | 20,0 | 5,0 |

Medijumi M4 i M7

Medijumi M4 i M7 pripremaju se od rastvora II, makronutrijenata i vitaminima na sledeći način:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Količina koja se dodaje u vodu (mg/l) | Koncentracija (u poređenju sa medijumom M4) puta | Za pripremanje kombinovanog rastvora II - dodati sledeću količinu osnovnog rastvora I u vodu (ml/L) | |
| M 4 | M 7 |
| Kombinovani rastvor II Elementi u tragovima |  | 20 | 50 | 50 |
| Osnovni rastvor sa makronutrijentima (pojedinačne supstanca) | | | | |
| CaCl2Í2H2O | 293.800 | 1.000 | 1,0 | 1,0 |
| MgSO4Í7H2O | 246.600 | 2.000 | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58.000 | 10.000 | 0,1 | 0,1 |
| NaHCO3 | 64.800 | 1.000 | 1,0 | 1,0 |
| Na2SiO3Í9H2O | 50.000 | 5.000 | 0,2 | 0,2 |
| NaNO3 | 2.740 | 10.000 | 0,1 | 0,1 |
| KH2PO4 | 1.430 | 10.000 | 0,1 | 0,1 |
| K2HPO4 | 1.840 | 10.000 | 0,1 | 0,1 |
| Kombinovani rastvor sa vitaminima | - | 10.000 | 0,1 | 0,1 |
| Kombinovani rastvor sa vitaminima se priprema dodavanjem 3 vitamina u 1 litru vode kako je prikazano dole: | | | | |
| Tiamin hidrohlorid | 750 | 10.000 | - | - |
| Cijankobalamin (B12) | 10 | 10.000 | - | - |
| Biotin | 7,5 | 10.000 | - | - |
| Kombinovani rastvor sa vitaminima se čuva zamrznut u malim porcijama. Vitamini se dodaju medijumu neposredno pre upotrebe. *Napomena 1:* Da bi se prilikom pripreme kompletnog medija izbeglo taloženje soli, alikvote osnovnih rastvora dodavati u oko 500 do 800 ml dejonizovane vode i potom dopuniti do 1 L. *Napomena 2:* Receptura za pripremu medijuma M4 prvi put je objavljena u "Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructuralapproach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33." | | | | |

**Deo treći**

**ANALIZA UKUPNOG ORGANSKOG UGLJENIKA (TOC) I IZRADA NOMOGRAMA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOC U HRANI OD ALGI**

Sadržaj ugljenika u hrani od algi u normalnim okolnostima ne određuje se direktno, već na osnovu poređenja (tj. nomograma), merenjem surogat pokazatelja poput broja algalnih ćelija ili apsorbance svetla.

TOC meriti metodom oksidacije pri visokoj temperaturi**XXXI**, a ne UV ili persulfatnom metodom.

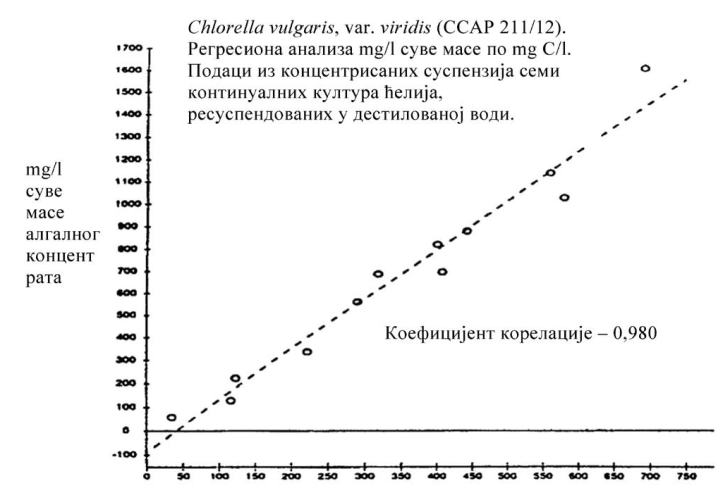
Za izradu nomograma, alge centrifugiranjem odvojiti od hranljive podloge i potom resuspendovati u destilovanoj vodi. U svakom uzorku, u triplikatu, izmeriti surogat pokazatelj i koncentraciju TOC. Kao slepa proba uzima se destilovana voda. Određuje se i koncentracija TOC u destilovanoj vodi, koja se zatim oduzme od koncentracijeTOC dobijene iz uzoraka algi.

Nomogram je linearan u opsegu predviđenih koncentracija ugljenika. U nastavku su dati primeri.

Napomena 1: Primeri se ne koriste za preračunavanje - svaka laboratorija izrađuje sopstveni nomogram.

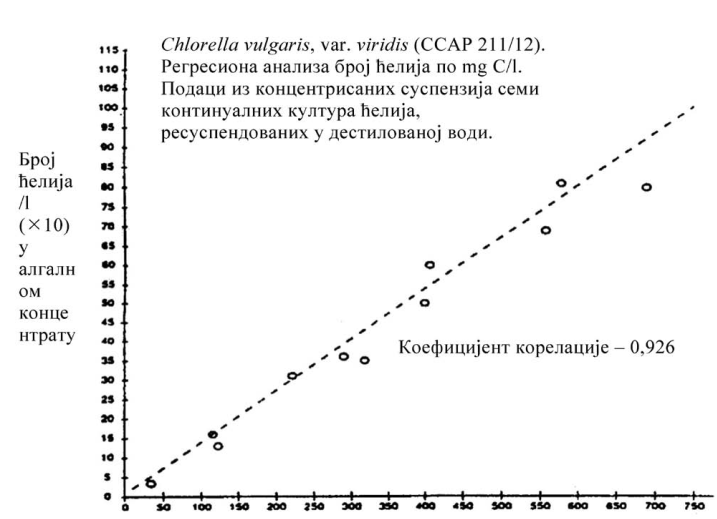
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXI** The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB

Slika 1:



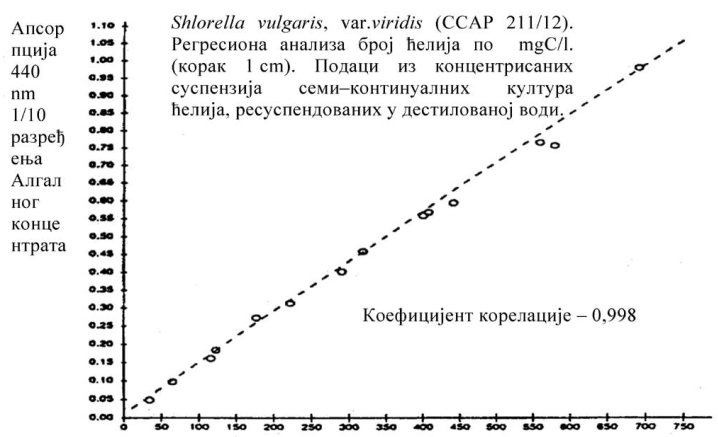
mg C/l algalni koncentrat

Slika 2:



mg C/l algalni koncentrat

Slika 3:



mg C/l algalni koncentrat

**Deo četvrti**

**PRIMER OBRASCA SA PODACIMA O PROMENI MEDIJUMA, PRAĆENJU FIZIČKO-HEMIJSKIH SVOJSTAVA, ISHRANI, RAZMNOŽAVANJU DAFNIJA I SMRTNOSTI ODRASLIH JEDINKI**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Eksperiment br: | Datum početka: | Klon: | Medijum: | Vrsta hrane: | Ispitivana supstanca: | Nominalna konc.: |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dan | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |  |  |
| Promena medijuma |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| pH**XXXII** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2. merenje |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1. merenje |  |
| O2 mg/l**XXVIII** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2. merenje |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1. merenje |  |
| Temperatura(°C)**XXVII** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2. merenje |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1. merenje |  |
| Hrana data (štiklirati) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Broj živih potomaka**XXXIII** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Ukupno |
| Posuda 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Ukupno |
| Kumulativna smrtnost odraslih jedinki**XXXIV** | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXII** Naznačiti koja posuda se koristila za testiranje.  
**XXXIII** Navesti smrtnost odraslih jedinki kao "M" u odgovarajuće polje.  
**XXXIV** Navesti odbačena legla kao "o.l." u odgovarajuća polja

**Deo peti**

**PRIMER OBRASCA SA PODACIMA O REZULTATIMA HEMIJSKIH ANALIZA**

Izmerene koncentracije

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nominalna koncentracija | Uzorak 1. sedmice | | Uzorak 2. sedmice | | Uzorak 3. sedmice | |
| Novo | Staro | Novo | Staro | Novo | Staro |
|  |  |  |  |  |  |  |

Izmerene koncentracije kao procenat nominalne

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nominalna koncentracija | Uzorak 1. sedmice | | Uzorak 2. sedmice | | Uzorak 3. sedmice | |
| Novo | Staro | Novo | Staro | Novo | Staro |
|  |  |  |  |  |  |  |

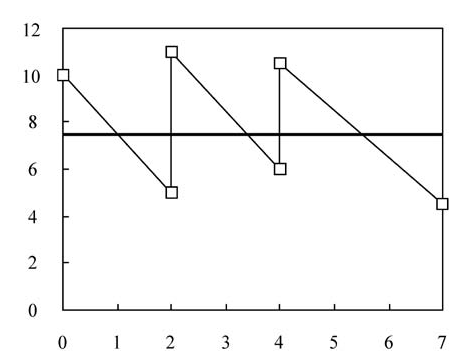
**Deo šesti**

**IZRAČUNAVANJE SREDNJE VREDNOSTI KONCENTRACIJE U FUNKCIJI VREMENA**

Težinska srednja vrednost u funkciji vremena

Ako se uzme da se koncentracija ispitivane supstance može smanjiti između dve promene medijuma, važno je odrediti koja će koncentracija predstavljati opseg koncentracija kojima je roditeljska jedinka bila izložena. Izbor se bazira na biološkim i statističkim pokazateljima. Na primer, ako se zaključi da na sposobnost razmnožavanja najviše utiče najviša koncentracija ispitivane supstance, onda se najviša koncentracija i uzima. Ako se zaključi da su važniji efekti koji se akumuliraju ili da je važnije dugoročno delovanje, onda je merodavnija prosečna koncentracija. U tom slučaju primerenije je služiti se težinskom srednjom vrednošću koncentracije u funkciji vremena, jer se tako uzimaju u obzir i kolebanja koncentracije koja se zbivaju u toku vremena.

Slika 1: Primer težinske srednje vrednosti



Slika 1 prikazuje (pojednostavljen) primer ispitivanja koje traje 7 dana sa prosečnom promenom medijuma nultog, 2. i 4. dana:

- tanka cik-cak crta prikazuje koncentraciju u bilo kojoj vremenskoj tački. Pretpostavka je da se smanjenje koncentracije zbiva po eksponencijalnom obrascu.

- šest ucrtanih tačaka predstavljaju koncentracije izmerene na početku i na kraju svakog razdoblja promene medijuma.

- puna debela crta pokazuje položaj težinske srednje vrednosti u funkciji vremena.

Težinska srednja vrednost u funkciji vremena računa se tako da se uzme da je površina ispod krive srednje vrednosti u toku vremena jednaka površini ispod krive koncentracije. Način računanja u gornjem primeru prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1: Izračunavanje težinske srednje vrednosti u funkciji vremena

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Broj promena medijuma | Dani | Conc0 | Conc1 | ln(Conc0) | ln(Conc1) | Površina |
| 1 | 2 | 10,000 | 4,493 | 2,303 | 1,503 | 13,767 |
| 2 | 2 | 11,000 | 6,037 | 2,398 | 1,798 | 16,544 |
| 3 | 3 | 10,000 | 4,066 | 2,303 | 1,403 | 19,781 |
| Ukupni dani: 7 | | | | | Ukupna površina | 50,091 |
|  | | | | | Težinska srednja vrednost | 7,156 |

Dani označavaju broj dana u razdoblju jedne promene medijuma.

Conc0 jeste koncentracija izmerena na početku svakog razdoblja promene medijuma.

Conc1 jeste koncentracija izmerena na kraju svakog razdoblja promene medijuma.

ln(Conc0) jeste prirodni logaritam Conc0.

ln(Conc1) jeste prirodni logaritam Conc1.

Površina jeste površina ispod eksponencijalne krive za svako razdoblje promene medijuma, računa se:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Površina = | COrnc0 - Conc1 | x Dani |
| In(Conc0) - In(Conc1) |

Težinska srednja vrednost jeste ukupna površina podeljena ukupnim danima.

Za ispitivanje toksičnosti po reprodukciju dafnije tabela obuhvata 21 dan ispitivanja.

Ako se merenja obavljaju samo na početku i na kraju razdoblja promene medijuma, nije moguće potvrditi da je proces smanjivanja koncentracije ispitivane supstance zapravo eksponencijalan. Ako kriva izgleda drugačije, menja se i vrednost površine. Eksponencijalni obrazac smanjivanja koncentracije ispitivane supstance nije neprihvatljiv i to je verovatno najupotrebljivija kriva u nedostatku drugih podataka.

Neophodan je oprez ako se hemijskom analizom na kraju razdoblja promene medijuma ispitivana supstanca ne nađe. Osim ako je moguće meriti kojom brzinom supstanca nestaje iz rastvora, nema načina da se dobije verodostojna površina ispod krive, te je u tom slučaju zapravo nemoguće dobiti smislenu srednju vrednost u funkciji vremena.

**C.21. ZEMLJIŠNI MIKROORGANIZMI: ISPITIVANJE TRANSFORMACIJE AZOTA**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 216 (2000).

*1.1. UVOD*

Ova metoda ispitivanja opisuje laboratorijsku metodu za procenu dugoročnih efekata hemikalija na proces mikrobiološke transformacije azota u zemljištu, pri jednokratnom izlaganju. Metoda se bazira na preporukama Evropske i Mediteranske Organizacije za zaštitu bilja**1**. Uzete su u obzir i smernice Nemačkog državnog instituta za biologiju**2**, Američke agencije za zaštitu životne sredine**3**, SETAC**4** i Međunarodne organizacije za standardizaciju**5**. Na OECD radionici na temu izbora zemljišta/sedimenta**6** postignut je dogovor o broju i tipu zemljišta za potrebe ovog ispitivanja. Preporuke za sakupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka zemljišta baziraju se na ISO standardu**7** i preporukama sa radionice. U proceni i evaluaciji toksičnih svojstava ispitivane supstance, u nekim slučajevima je potrebno odrediti njihov uticaj na aktivnost zemljišnih mikroorganizama. Recimo kada su potrebni podaci o mogućem negativnom delovanju sredstava za zaštitu bilja na zemljišnu mikrofloru, ili kada se očekuje izloženost zemljišnih mikroorganizama drugim hemikalijama. Ispitivanje transformacije azota služi za procenu efekata takvih hemikalija na zemljišne mikroorganizme. Ako se ispituju agrohemikalije (sredstva za zaštitu bilja, đubriva, hemikalije u šumarstvu) izvodi se i ispitivanje transformacije ugljenika uporedo sa ispitivanjem transfromacije azota. Ako se ispituju hemikalije koje se ne koriste u poljoprivredne svrhe, ispitivanje transformacije azota je dovoljno. Ukoliko se vrednost EC50 dobijena iz ispitivanja transformacije azota za date hemikalije nalazi u opsegu EC50 vrednosti koje su utvrđene za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapirin), može se izvesti ispitivanje transformacije ugljenika da bi se dobilo više podataka.

Zemljište se sastoji od žive i nežive komponente koje egzistiraju u kompleksnim i heterogenim smešama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razgradnji i transformaciji organske materije. U plodnim zemljištima, veliki broj vrsta mikroorganizama doprinosi različitim aspektima plodnosti zemljišta. Bilo kakav dugoročni uticaj na ove biohemijske procese može potencijalno uticati na procese kruženja nutrijenata, što može uticati na plodnost zemljišta. Transformacija ugljenika i azota odvija se u svim tipovima plodnih zemljišta. Iako se mikrobiološke zajednice razlikuju od zemljišta do zemljišta, putevi transformacije nutrijenata su u osnovi isti.

Ova metoda ispitivanja služi za procenu dugoročnih negativnih efekata supstanci na proces transformacije azota u aerobnim površinskim slojevima zemljišta. Metoda omogućava i procenu efekta supstance na transformaciju ugljenika od strane zemljišnih mikroorganizama. Obrazovanje nitrata se događa nakon prekidanja hemijske veze ugljenik-azot. Ako su zabeležene iste brzine obrazovanja nitrata u tretmanima i u kontroli, može se pretpostaviti da ne postoji negativan uticaj na glavne puteve razgradnje ugljenika. Supstrat za potrebe ispitivanja (hranivo od lucerke u prahu) ima povoljan odnos ugljenik/azot (obično između 12/1 i 16/1). Zahvaljujući tome, dovoljna količina ugljenika je na raspolaganju mikroorganizmima u toku ispitivanja, a ukoliko se ispolji negativno dejstvo hemikalija na mikrobnu zajednicu, mogu se oporaviti u periodu od 100 dana.

Ispitivanja na kojima se zasniva ova metoda primarno su bila osmišljena za supstance za koje se može proceniti u kojoj količini dospevaju u zemljište. To je npr. slučaj sa sredstvima za zaštitu bilja za koje je poznat režim primene. Kad je reč o agrohemikalijama dovoljno je ispitivanje dve doze koje odgovaraju očekivanom ili predviđenom režimu primene u polju. Agrohemikalije se mogu ispitivati kao aktivni sastojci ili kao formulacije. Ispitivanje nije ograničeno samo na agrohemikalije. Promenom količine ispitivane supstance primenjene na zemljište i načina na koji se podaci evaluiraju mogu se ispitivati i hemikalije za koje nije poznato u kojoj količini dospevaju do zemljišta. Za hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuje se serija koncentracija i ispituje njihov efekat na transformaciju azota. Podaci iz ovih ispitivanja koriste se za dobijanje krive dozne zavisnosti i za procenu ECx vrednosti, gde je x unapred definisani procenat efekta.

*1.2. DEFINICIJE*

Transformacija azota jeste potpuna mikrobiološka razgradnja organske materije koja sadrži azot, preko procesa stvaranja amonijaka i nitrita do obrazovanja nitrata.

Efektivna koncentracija (u daljem tekstu: ECx) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procenjuje inhibicija transformacije azota u nitrate za unapred definisan procenat x.

Srednja efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC50) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procenjuje 50% inhibicija transformacije azota u nitrate.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Za ovu metodu ispitivanja nisu propisane referentne supstance.

*1.4. PRINCIP METODE*

Prosejano zemljište obogaćuje se biljnim hranivom u prahu i zatim se tretira sa ispitivanom supstancom ili ostavi netretirano (kontrola). Ako se ispituju agrohemikalije, preporučuje se ispitivanje minimalno dve koncentracije ispitivane supstance i one da budu određene u odnosu na najveću koncentraciju očekivanu na njivama. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije, uzorci zemljišta za ispitivanu i kontrolnu grupu se ekstrahuju sa odgovarajućim rastvaračem i određuje se količina azota u ekstraktima. Brzina obrazovanja azota u ispitivanim grupama poredi se sa brzinom obrazovanja u kontrolnim grupama i izračunava se procenat odstupanja u odnosu na kontrolu. Sva ispitivanja traju najmanje 28 dana. Ako je 28. dana razlika između ispitivanih i kontrolnih grupa jednaka ili veća od 25%, ispitivanje se produžuje do maksimalno 100 dana. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivana supstanca se dodaje uzorcima zemljišta u seriji koncentracija i meri se količina obrazovanog azota u ispitivanim i kontrolnih grupama nakon 28 dana inkubacije. Rezultati ispitivanja sa više koncentracija ispitivane supstance analiziraju se regresionom analizom i izračunavaju se ECx vrednosti (npr. EC50, EC25, odnosno EC10).

*1.5. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Procene rezultata dobijenih ispitivanjem agrohemikalija baziraju se na relativno malim razlikama (npr. prosečna vrednost ± 25%) između koncentracija nitrata u ispitivanim i kontrolnih grupama, pa veliki procenat varijacije rezultata u kontrolnim grupama može dovesti do pogrešnih rezultata. Varijacije u kontroli da budu manje od ± 15%.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Oprema**

Koriste se posude napravljene od hemijski inertnog materijala. Posude da budu odgovarajuće zapremine u skladu sa procedurom za inkubaciju zemljišta, npr. inkubacija jedinstvenog uzorka ili u seriji pojedinačnih uzoraka zemljišta (videti odeljak 1.7.1.2. ove metode). Treba preduzeti mere za smanjenje gubitka vode i obezbediti nesmetanu razmenu gasova u toku ispitivanja (npr. posude se mogu prekriti perforiranom polietilenskom folijom). Pri ispitivanju isparljivih supstanci koriste se posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Zapremina posuda da bude četiri puta veća od zapremine samog uzorka zemljišta

Pored standardne laboratorijske aparature koriste se:

- mešalica (mehanički uređaj ili druga odgovarajuća oprema);

- centrifuga (3.000 g) ili uređaj za filtraciju (filter papir bez nitrata);

- uređaj za analizu nitrata odgovarajuće osetljivosti i ponovljivosti merenja.

**1.6.2. Izbor i broj vrsta zemljišta**

Koristi se jedna vrsta zemljišta. Preporučena svojstva zemljišta su:

- sadržaj peska ne manji od 50% i ne veći od 75%;

- pH vrednost 5,5 do 7,5;

- sadržaj organskog ugljenika 0,5% do 1,5%;

- najmanje 1% ukupnog sadržaja organskog ugljenika u zemljištu potiče iz mikrobiološke biomase**8,9** koju je potrebno izmeriti.

U većini slučajeva ovakav sastav zemljišta odlikuju najlošija svojstva, s obzirom na to da je adsorpcija ispitivane supstance minimalna, a njena biodostupnost maksimalna. Prema tome, ispitivanja sa drugim tipovima zemljišta nisu neophodna. Ipak u određenim slučajevima, npr. kada se očekuje najviša primena ispitivane supstance na posebnim tipovima zemljišta poput kiselih šumskih zemljišta, ili su u pitanju hemikalije sa elektrostatičkim nabojem, postoji potreba za dodatnim ispitivanjem i drugih vrsta zemljišta.

**1.6.3. Sakupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta**

*1.6.3.1. Sakupljanje*

Potrebno je raspolagati detaljnim podacima o lokalitetu sa kog su uzeti uzorci zemljišta za potrebe ispitivanja. Podaci uključuju tačnu lokaciju uzorkovanja, biljni pokrivač, datume primene sredstava za zaštitu bilja, tretmane sa organskim i neorganskim đubrivima, upotrebu bioloških materijala ili kontaminacije usled nesrećnog slučaja. Mesto izabrano za uzimanje uzoraka zemljišta omogućava dugotrajnu upotrebu. Pogodni lokaliteti za uzorkovanje su trajni pašnjaci, njive pod jednogodišnjim žitaricama (osim kukuruza), ili gusto zasejane, nađubrene površine. Izabrani lokalitet ne sme biti tretiran nikakvim organskim đubrivom najmanje šest meseci. Upotreba mineralnih đubriva je prihvatljiva samo u količini potrebnoj za normalan rast i razvoj bilja, a uzorci zemljišta se mogu uzimati najmanje tri meseca nakon primene đubriva. Treba izbegavati ispitivanje zemljišta tretiranog đubrivima sa poznatim biocidnim efektima, npr. kalcijum-cijanamidom.

Uzorkovanje izbegavati u toku ili neposredno nakon dugih perioda suše (dužih od 30 dana) ili zadržavanja vode. Za preorana zemljišta uzimati uzorke sa dubine od 0 cm do 20 cm. Za travnjake (pašnjake) ili druga zemljišta koja nisu duže vreme orana (najmanje jednu sezonu), maksimalna dubina uzorkovanja može biti nešto viša od 20 cm, npr. do 25 cm).

Uzorke zemljišta transportovati u odgovarajućim posudama i temperaturnim uslovima koji omogućavaju nepromenjivost svojstva zemljišta u toku transporta.

*1.6.3.2. Skladištenje*

Poželjno je ispitivati uzorke zemljišta neposredno nakon uzorkovanja. Ukoliko se uzorci ne mogu odmah ispitivati, skladište se u mraku na temperaturi od 4° C ± 2° C, maksimum tri meseca. U toku skladištenja obezbediti aerobne uslove. Ako se uzorci zemljišta uzimaju sa mesta gde je zemljište smrznuto najmanje tri meseca u toku godine, razmotriti skladištenje uzorka na temperaturi od - 18° C do - 22° C. Mikrobiološka biomasa skladištenih uzoraka zemljišta meri se pre početka svakog ispitivanja, a sadržaj ugljenika u biomasi je najmanje 1% ukupnog organskog ugljenika u zemljištu (videti odeljak 1.6.2. ove metode).

**1.6.4. Rukovanje i priprema uzoraka zemljišta za ispitivanje**

*1.6.4.1. Predinkubacija*

Ako su uzorci zemljišta skladišteni (videti odeljak 1.6.3.2. ove metode), preporučuje se predinkubacija u trajanju od 2 do 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage u uzorcima u toku predinkubacije da budu približni zahtevima ispitivanja (videti odeljak 1.6.4.2. i 1.7.1.3. ove metode).

*1.6.4.2. Fizička i hemijska svojstva*

Uzorci zemljišta se ručno čiste od velikih predmeta (npr. kamenje, delovi biljaka, itd) i mokro prosejavaju bez suvišnog sušenja na čestice veličine manje ili jednake od 2 mm. Sadržaj vlage u uzorku zemljišta podesiti destilovanom ili dejonizovanom vodom na vrednost između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode.

*1.6.4.3. Obogaćivanje organskim supstratom*

Zemljište obogatiti odgovarajućim organskim supstratom, npr. hranivom od lucerke u prahu (glavni sastojak: *Medicago sativa*) sa odnosom C/N između 12/1 i 16/1. Preporučen odnos lucerke i zemljišta je 5 g lucerke po kilogramu zemljišta (suve težine).

**1.6.5. Priprema ispitivane supstance za ispitivanje na uzorcima zemljišta**

Ispitivana supstanca se obično primenjuje uz upotrebu nosača. Nosač može biti voda (za supstance rastvorljive u vodi) ili inertni materijal poput finog kvarcnog peska (veličina čestica: 0,1 mm do 0,5 mm). Treba izbegavati upotrebu tečnih nosača, osim vode (npr. organski rastvarači kao aceton, hloroform) s obzirom na to da deluju negativno na mikrofloru. Ukoliko se koristi pesak kao nosač, može se prekriti sa ispitivanom supstancom rastvorenom ili suspendovanom u odgovarajući rastvarač. U takvim slučajevima, rastvarač ukloniti isparavanjem pre mešanja sa zemljištem. Za optimalnu distribuciju ispitivane supstance u zemljištu, preporučuje se odnos od 10 g peska po kilogramu zemljišta (suve težine). Kontrolni uzorci se tretiraju samo sa ekvivalentnom količinom vode, odnosno kvarcnog peska.

Kod ispitivanja isparljivih supstanci izbegavati gubitke u toku ispitivanja i omogućiti njenu homogenu raspodelu u zemljištu (npr. ispitivanu supstancu injektirati u zemljište na nekoliko mesta).

**1.6.6. Koncentracije ispitivane supstance**

Ako se isputuju agrohemikalije, koristiti najmanje dve koncentracije ispitivane supstance. Niža koncentracija odgovara najmanje maksimalnoj količini ispitivane supstance za koju se očekuje da će dospeti do zemljišta u realnim uslovima, dok je viša koncentracija umnožak niže koncentracije. Koncentracije ispitivane supstance dodate uzorcima zemljišta izračunavaju se uz pretpostavku da je ona ravnomerno raspodeljena do dubine od 5 cm i da je gustina zemljišta 1,5. Za agrohemikalije koje se primenjuju direktno na zemljište, ili za hemikalije za koje se može predvideti količina koja dospeva do zemljišta, preporučene koncentracije za ispitivanje su maksimalna predvidljiva koncentracija u životnoj sredini (Predictable Environmental Concentration, u daljem tekstu: PEC) i koncentracije pet puta veće od vrednosti PEC. Supstance koje će biti primenjene na zemljište više puta u jednoj sezoni ispitivati u koncentracijama dobijenim množenjem vrednosti PEC sa maksimalnim brojem predviđenih primena. Ipak, viša koncentracija ne sme biti veća od desetostruke vrednosti najveće primenjene koncentracije po pojedinačnoj primeni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije. Koristi se geometrijska serija od najmanje pet koncentracija ispitivane supstance. Koncentracije ispitivane supstance pokrivaju opseg potreban za određivanje ECx vrednosti.

*1.7. IZVOĐENJE ISPITIVANJA*

**1.7.1. Uslovi izloženost**

*1.7.1.1. Ispitivane i kontrolne grupe*

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zemljišta se deli u tri uzorka jednake težine. Dva uzorka se mešaju sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a treći sa nosačem bez ispitivane supstance (kontrola). Preporučuju se minimalno tri ponavljanja za svaki uzorak, sa i bez ispitivane supstance. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, zemljište se deli u šest uzoraka jednake težine. Pet uzoraka se meša sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a šesti sa nosačem bez ispitivane supstance. Preporučaju se tri ponavljanja po svakom uzorku, sa i bez ispitivane supstance. Treba omogućiti homogenu raspodelu supstance u ispitivanim uzorcima zemljišta. Tokom mešanja izbegavati presovanje ili gnječenje zemljišta.

*1.7.1.2. Inkubacija uzoraka zemljišta*

Razlikuju se dva načina inkubacija uzoraka zemljišta zavisno od toga da li su u pitanju jedinstveni uzorci svakog ispitivanog i svakog kontrolnog uzorka zemljišta ili serije pojedinačnih poduzoraka jednake veličine za ispitivane i za kontrolne uzorke zemljišta. U slučaju isparljivih supstanci ispitivanje, ipak, izvesti samo sa serijama pojedinačnih poduzoraka. Kada se zemljište inkubira kao jedan jedinstveni uzorak, pripremaju se velike količine zemljišta za ispitivane i kontrolne grupe i po potrebi uzimaju se poduzorci i analiziraju. Količina inicijalno pripremljenih uzoraka za eksperimentalne i kontrolne grupe zavisi od veličine poduzoraka, broja ponavljanja i predviđenog maksimalnog broja uzorkovanja. Zemljišta inkubirana kao jedinstveni uzorak dobro promešati pre uzimanja poduzoraka. Kada se uzorci inkubiraju u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta, osnovni uzorak za ispitivane i kontrolne uzorke deli se na traženi broj poduzoraka i oni se koriste po potrebi. U ispitivanjima gde se može očekivati više od dva uzorkovanja, obezbediti dovoljan broj poduzoraka koji može da bude dovoljan za sva ponavljanja i svako uzorkovanje. Treba uraditi najmanje tri ponavljanja po koncentraciji ispitivane supstance i inkubirati u aerobnim uslovima (videti odeljak 1.7.1.1. ove metode). Tokom svih ispitivanja, koristiti adekvatne posude koje onemogućavaju razvijanje anaerobnih uslova. U slučaju isparljivih supstanci, ispitivanje se izvodi samo sa serijom pojedinačnih poduzoraka.

*1.7.1.3. Uslovi i trajanje ispitivanja*

Ispitivanje se vrši u mraku na temperaturi 20° C ± 2° C. Sadržaj vlage u uzorcima zemljišta održavati između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode u zemljištu (videti odeljak 1.6.4.2. ove metode) sa odstupanjima od ± 5%. Po potrebi, može se dodavati destilovana, dejonizovana voda.

Minimalno trajanje ispitivanja je 28 dana. Ako se ispituju agrohemikalije, upoređuju se brzine stvaranja nitrata u ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu. Ako se 28. dana ove vrednosti razlikuju za više od 25% ispitivanje se nastavlja dok se ne postigne razlika ≤ 25% ili maksimalno do 100 dana, zavisno koji uslov se pre ispuni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivanje se prekida nakon 28 dana. Tada se određuju količine nitrata u ispitivanim i kontrolnim uzorcima zemljišta i izračunava ECx vrednost.

**1.7.2. Uzorkovanje i analiza zemljišta**

*1.7.2.1. Šema uzorkovanja zemljišta*

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, određuje se sadržaj nitrata u uzorcima zemljišta na početku ispitivanja, 7, 14. i 28. dana. Ako je potrebno produžiti ispitivanje, obaviti dodatna merenja svakih 14 dana nakon 28. dana.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituje se najmanje pet koncentracija ispitivane supstance i sadržaj nitrata se određuje u uzorcima zemljišta na početku (dan 0) i na kraju perioda izlaganja (28. dan). Ukoliko se pokaže potrebnim dodatno merenje se može obaviti sredinom tog perioda, npr. sedmog dana. Podaci dobijeni 28. dana koriste se u određivanju ECx vrednosti za datu hemikaliju. Podaci dobijeni iz kontrolnih uzoraka na početku ispitivanja mogu se koristiti i u procenjivanju sadržaja nitrata u zemljištu.

*1.7.2.2. Analiza uzoraka zemljišta*

Količina obrazovanog azota u svakom ponavljanju za uzorke zemljišta ispitivane i kontrolne grupe određuje se pri svakom vremenu uzorkovanja. Nitrati se ekstrahuju iz zemljišta mešanjem uzoraka sa odgovarajućim ekstrakcionim sredstvima, npr. 0,1 M rastvor kalijum hlorida. Preporučuje se odnos od 5 ml rastvora KCl po gramu suve težine ekvivalenta zemljišta. Da bi ekstrakcija bila optimalna, posude sa zemljištem i ekstrakcionim sredstvom ne treba da budu napunjene više od polovine. Smeše se mešaju na 150 rpm 60 minuta. Smeše se centrifugiraju ili filtriraju i u supernatantu se određuje sadržaj nitrata. Supernatant se može pre analize čuvati do šest meseci na -20° C ± 5° C.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Ako se ispituju agrohemikalije, beleži se količina obrazovanog azota u svakom poduzorku zemljišta, a srednje vrednosti svih poduzoraka za kontrolnu i ispitivanu grupu prikazati tabelarno. Brzina transformacije azota određuje se odgovarajućim i opšte prihvatljivim statističkim metodama (F-test, nivo značaja 5%). Količina obrazovanog azota izražava se u mg azota/kg suve težine zemljišta/dan. Brzina stvaranja azota u svakoj ispitivanoj grupi poredi se sa kontrolnom grupom i računa se procenat odstupanja od kontrole.

Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuju se količine obrazovanog azota u svakom poduzorku i pravi se kriva dozne zavisnosti za procenu ECx vrednosti. Količine azota (npr. mg azota/kg suve težine zemljišta) u ispitivanim grupama nakon 28 dana porede se sa količinom azota nastalom u kontroli. Iz tih podataka se računa procenat inhibicije za svaku koncentraciju ispitivane supstance. Vrednosti procenata inhibicije prikazuju se grafički u funkciji koncentracija ispitivane supstance, a za određivanje ECx vrednosti koriste se statističke procedure. Intervali poverenja (p = 0,95) za izračunate ECx određuju se i putem standardnih procedura**10,11,12**.

Supstance koje sadrže visoke količine azota doprinose količini azota koja nastaje u toku ispitivanja. Ako se te supstance ispituju u višoj koncentraciji (hemikalije za koje se očekuje da će se primenjivati u više navrata), u ispitivanje uključiti odgovarajuće kontrole (npr. zemljište sa ispitivanom supstancom, ali bez biljnog hraniva). Podatke iz tih kontrola uzeti u obzir pri računanju ECx vrednosti.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Kada se procenjuju rezultati ispitivanja sa agrohemikalijama i kad je razlika u brzini stvaranja azota između prve ispitivane grupe u seriji (maksimalna predviđena koncentracija) i kontrole ≤ 25% u bilo kojem vremenu uzorkovanja nakon 28. dana, za date hemikalije se može oceniti da nemaju dugoročni uticaj na transformaciju azota u zemljištu. Kada se procenjuju rezultati dobijeni ispitivanjem supstanci koje nisu agrohemikalije, koriste se EC50, EC25, odnosno EC10 vrednosti.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju korišćenog zemljišta, uključujući:

- geografske odrednice mesta (geografska širina i dužina);

- podatke o istoriji mesta (npr. biljni pokrivač, tretmani sredstvima za zaštitu bilja, tretmani đubrivima, akcedentne kontaminacije itd.);

- upotreba zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd.);

- dubina uzorkovanja (cm);

- sadržaj peska/mulja/gline (% suve težine);

- pH vrednosti (u vodi);

- sadržaj organskog ugljenika (% suve težine);

- sadržaj azota (% suve težine);

- početna koncentracija azota (mg azota/kg suve težine);

- jonsko izmenjivački kapacitet (mmol/kg);

- početna biomasa mikroorganizama u procentima u odnosu na ukupan organski ugljenik;

- reference svih metoda korišćenih za određivanje svakog parametra;

- svi podaci u vezi sa sakupljanjem i skladištenjem uzoraka zemljišta;

- detalji o predinkubaciji, ako postoje.

2) podatke o ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i gde je bitno, fizička i hemijska svojstva;

- podaci za hemijsku identifikaciju, gde je bitno, uključujući strukturnu formulu, stepen čistoće (npr. za sredstva za zaštitu bilja, procenat aktivnog sastojka), sadržaj azota.

3) podatke o supstratu:

- poreklo supstrata;

- sastav (npr. hraniva sa lucerkom);

- sadržaj ugljenika, azota (% suve težine);

- veličina sita (mm).

4) podatke o uslovima ispitivanja:

- opis načina obogaćivanja zemljišta organskim supstratom;

- broj koncentracija ispitivane supstance i gde je prikladno, opravdanje za izbor datih koncentracija;

- opis uvođenja ispitivane supstance u zemljište;

- temperatura inkubacije;

- sadržaj vlage u zemljištu na početku i u toku ispitivanja;

- korišćena metoda inkubacije zemljišta (npr. kao jedinstveni uzorak ili kao serija pojedinačnih poduzoraka);

- broj ponavljanja;

- broj uzorkovanja;

- metoda korišćena za ekstrakciju azota iz zemljišta;

5) podatke o rezultatima:

- procedure i oprema za analitičko određivanje azota;

- tabelarni podaci uključujući pojedinačne i srednje vrednosti za merenje azota;

- varijansa u kontrolnim i eksperimentalnim grupama;

- objašnjene korekcija u izračunavanju, ukoliko je bitno;

- procenat razlike brzine stvaranja azota pri svakom vremenu uzorkovanja, ili, ako je prikladno, EC50 sa 95% intervalima poverenja, druge ECx vrednosti (npr. EC25 ili EC10) sa intervalima pouzdanosti i grafik krive dozne zavisnosti;

- statistička obrada rezultata;

- sve dodatne podatke i opažanja potrebne za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant ProtectionChemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2. BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of PlantProtection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3. EPA (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic SubstancesControl Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4. SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed.M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5. ISO/DIS 14238 (1995) Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification inSoils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: SoilQuality - Biological Methods.

6. OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

7. ISO 10381-6 (1993) Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soilfor the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8. ISO 14240-1, (1997) Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrateinducedrespiration method.

9. ISO 14240-2, (1997) Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigationextractionmethod.

10. Litchfield, J.T. and Wilcoxon F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour.Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

11. Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

12. Finney, D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

**C.22. ZEMLJIŠNI MIKROORGANIZMI: ISPITIVANJE TRANSFORMACIJE UGLJENIKA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 217 (2000).

*1.1. UVOD*

Ova metoda ispitivanja opisuje laboratorijski postupak za procenu dugoročnih potencijalnih efekata sredstava za zaštitu bilja i, ako je moguće, drugih hemikalija na aktivnost transformacije ugljenika od strane zemljišnih mikroorganizama pri jednokratnom izlaganju. Metoda se bazira na preporukama Evropske i Mediteranske Organizacije za zaštitu bilja (European and Mediterranean Plant Protection Organization)**1**. Uzete su u obzir i druge smernice, uključujući smernice Nemačkog državnog instituta za biologiju (Biologische Bundesanstalt)**2**, Američke agencije za zaštitu životne sredine (US Environmental Protection Agency)**3** i SETAC**4**. Na OECD radionici na temu izbora zemljišta/sedimenta**5** postignut je dogovor o broju i tipu zemljišta za potrebe ovog ispitivanja. Preporuke za sakupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka zemljišta temelje se na ISO standardu**6** i preporukama radionice.

U proceni i evaluaciji toksičnih efekata ispitivane supstance, utvrđivanje efekta na aktivnost zemljišnih mikroorganizama može biti neophodno, npr. kada se traže podaci o mogućem negativnom delovanju sredstava za zaštitu bilja na zemljišnu mikrofloru ili kada se očekuje izloženost zemljišnih mikroorganizama drugim hemikalijama koje ne spadaju u sredstva za zaštitu bilja. Ispitivanje transformacije ugljenika izvodi se u cilju procene efekta hemikalija na zemljišnu mikrofloru. Ako se ispituju agrohemikalije (npr. sredstva za zaštitu bilja, đubriva, hemikalije u šumarstvu), izvodi se i ispitivanje transformacije ugljenika i transformacije azota. Ako se ispituju druge hemikalije, ispitivanje transformacije azota je dovoljno. Ukoliko se vrednost EC50 dobijena iz ispitivanja transformacije azota za date hemikalije nalazi u opsegu EC50 vrednosti koje su utvrđene za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapyrin), može se izvesti ispitivanje transformacije ugljenika da bi se dobilo više podataka.

Zemljište se sastoji od žive i nežive komponente koje egzistiraju u kompleksnim i heterogenim smešama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razgradnji i transformaciji organske materije. U plodnim zemljištima sa velikim brojem vrsta, mikroorganizmi doprinose različitim aspektima plodnosti zemljišta. Bilo kakav dugoročni uticaj na biohemijske procese može potencijalno odraziti na procese kruženja nutrijenata, a ovo opet na plodnost zemljišta. Transformacija ugljenika i azota odvija se u svim tipovima plodnih zemljišta. Iako se mikrobiološke zajednice razlikuju od zemljišta do zemljišta, putevi transformacije nutrijenata su u osnovi isti.

Ova metoda ispitivanja služi za procenu dugoročnih negativnih efekata supstanci na proces transformacije ugljenika u aerobnim površinskim slojevima zemljišta. Metoda je dovoljno osetljiva da detektuje promene u veličini i aktivnosti mikrobnih zajednica koje su odgovorne za transformaciju ugljenika s obzirom na to da su ovim ispitivanjem te zajednice izložene stresu usled izlaganja hemikalijama i stresu zbog smanjene količine ugljenika. Za potrebe ispitivanja koristi se peskovito zemljište sa niskim sadržajem organske materije. Zemljište se tretira sa ispitivanom supstancom i inkubira u uslovima koji omogućavaju brz mikrobiološki metabolizam. U ovakvim uslovima izvori raspoloživog ugljenika u zemljištu brzo se iscrpljuju. Smanjenje količine raspoloživog ugljenika na kraju dovodi do nestanka mikroorganizama ili nastupa faza dormancije, odnosno sporulacije. Ako ispitivanje traje više od 28 dana, posledice ovih reakcija mogu se meriti u kontroli (netretirano zemljište) kao progresivan gubitak metabolički aktivne mikrobiološke biomase**7**. Ako na biomasu mikroorganizama sa smanjenom količinom raspoloživog ugljenika u zemljištu, u uslovima definisanim za ovu metodu, deluje ispitivana supstanca, oporavak možda nije moguć. U većini slučajeva negativni uticaji uzrokovani ispitivanom supstancom u bilo kom momentu ispitivanja, traju do kraja ispitivanja.

Ispitivanja na kojima se zasniva ova metoda primarno su bila osmišljena za supstance za koje se može proceniti u kojoj količini mogu dospeti u zemljište. To je slučaj kod sredstava za zaštitu bilja sa poznatim režimom primene. Za agrohemikalije, dovoljno je ispitivanje dve doze koje odgovaraju očekivanom ili predviđenom režimu primene u polju. Agrohemikalije se mogu ispitivati kao aktivni sastojci ili kao formulacije. Ispitivanje nije ograničeno samo na hemikalije za koje se mogu predvideti njihove koncentracije u životnoj sredini. Promenom količine ispitivane supstance primenjene na zemljište i načina na koji se podaci procenjuju, ispitivanje se može koristiti i za hemikalije za koje se ne zna u kojoj količini dospevaju do zemljišta. Za hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuje se serija koncentracija i ispituje njihov efekat na transformaciju ugljenika. Podaci iz ovih ispitivanja koriste se za dobijanje krive dozne zavisnosti i za procenu ECx vrednosti, gde je x unapred definisan procenat efekta.

*1.2. DEFINICIJE*

Transformacija ugljenika jeste mikrobiološka razgradnja organske materije u ugljen-dioksid.

Efektivna koncentracija (u daljem tekstu: ECx) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procenjuje inhibicija transformacije ugljenika u ugljen-dioksid za unapred definisan procenat inhibicije x.

Srednja efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC50) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procenjuje 50% inhibicija transformacije ugljenika u ugljen-dioksid.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Za ovu metodu ispitivanja nisu određene referentne supstance.

*1.4. PRINCIP METODE*

Prosejano zemljište se tretira ispitivanom supstancom ili se ostavi netretirano (kontrola). Ako se ispituju agrohemikalije, preporučuje se ispitivanje najmanje dve koncentracije ispitivane supstance i one treba da budu određene u odnosu na najveću koncentraciju koja će se primeniti. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije, uzorci zemljišta ispitivane i kontrolne grupu mešaju se sa glukozom i meri se brzina glukozom indukovane respiracije za narednih 12 sati. Brzina respiracije izražava se kao oslobođeni ugljen-dioksid (mg ugljen-dioksida/ kg suvog zemljišta/h) ili kao utrošeni kiseonik (mg kiseonika/kg zemljišta/h). Srednja vrednost brzine respiracije u ispitivanim grupama poredi se sa brzinom u kontrolnim grupama i izračunava se procenat smanjenja u odnosu na kontrolu. Sva ispitivanja se izvode u trajanju najmanje 28 dana.

Ako su 28. dana razlike u brzini respiracije između ispitivanih i kontrolnih grupa ≥ 25%, merenja se nastavljaju na svakih 14 dana u trajanju najviše do 100 dana. Ako su u pitanju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituju se i dodatne koncentracije te supstance (ne samo dve) i meri se glukozom indukovana brzina respiracije (npr. srednja vrednost oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika) nakon 28 dana. Rezultati ispitivanja serije koncentracija analiziraju se korišćenjem regresionih modela i izračunavaju se ECx vrednosti (npr. EC50, EC25,odnosno EC10).

*1.5. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Procene rezultata dobijenih ispitivanjem agrohemikalija baziraju se na relativno malim razlikama (prosečna vrednost ± 25%) između oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika u ispitivanim i kontrolnim grupama, pa veliki procenat varijacije u kontrolnim grupama može uzrokovati pogrešan rezultat. Varijansa u kontroli je manja od ± 15%.

*1.6. OPIS METODE*

**1.6.1. Oprema**

Koriste se posude napravljene od hemijski inertnog materijala. Posude da budu odgovarajuće zapremine u skladu sa postupkom za inkubaciju zemljišta, npr. inkubacija jedinstvenog uzorka ili u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta (videti odeljak 1.7.1.2. ove metode). Preduzeti mere za smanjenje gubitka vode i obezbediti nesmetanu razmenu gasove u toku ispitivanja (posude se mogu prekriti perforiranom polietilenskom folijom). Kada se ispituju isparljive supstance, koristiti zatvorene posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Zapremina posuda da bude četiri puta veća od zapremine samog uzorka zemljišta.

Za određivanje glukozom indukovane respiracije, potrebni su sistemi za inkubaciju i instrumenti za merenje produkcije ugljen-dioksida ili potrošnje kiseonika. Primeri takvih sistema i instrumenata su u literaturi**8,9,10,11**.

**1.6.2. Izbor i broj vrsta zemljišta**

Koristi se jedna vrsta zemljišta. Preporučena svojstva zemljišta su:

- sadržaj peska ne manji od 50% i ne veći od 75%;

- pH vrednost 5,5 do 7,5;

- sadržaj organskog ugljenika 0,5% do 1,5%;

- najmanje 1% ukupnog sadržaja organskog ugljenika u zemljištu potiče iz mikrobiološke biomase**8,9** koju je potrebno izmeriti.

U većini slučajeva ovakav sastav zemljišta odlikuju najlošija svojstva, s obzirom na to da je adsorpcija ispitivane supstance minimalna, a njena biodostupnost maksimalna. Prema tome, ispitivanja sa drugim tipovima zemljišta nisu neophodna. Ipak u određenim slučajevima, npr. kada se očekuje najviša primena ispitivane supstance na posebnim tipovima zemljišta poput kiselih šumskih zemljišta, ili su u pitanju hemikalije sa elektrostatičkim nabojem, postoji potreba za dodatnim ispitivanjem i drugih vrsta zemljišta.

**1.6.3. Sakupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta**

*1.6.3.1. Sakupljanje*

Potrebno je raspolagati detaljnim podacima o lokalitetu sa kog su uzeti uzorci zemljišta za potrebe ispitivanja. Podaci uključuju tačnu lokaciju uzorkovanja, biljni pokrivač, datume primene sredstava za zaštitu bilja, tretmane sa organskim i neorganskim đubrivima, upotrebu bioloških materijala ili kontaminacije usled nesrećnog slučaja. Mesto izabrano za uzimanje uzoraka zemljišta neophodno je da omogući dugotrajnu upotrebu. Pogodni lokaliteti za uzorkovanje su trajni pašnjaci, njive pod jednogodišnjim žitaricama (osim kukuruza), ili gusto zasejane, nađubrene površine. Izabrani lokalitet ne sme biti tretiran nikakvim organskim đubrivom najmanje šest meseci. Upotreba mineralnih đubriva je prihvatljiva samo u količini potrebnoj za normalan rast i razvoj bilja, a uzorci zemljišta se mogu uzimati najmanje tri meseca nakon primene đubriva. Treba izbegavati ispitivanje zemljišta tretiranog đubrivima sa poznatim biocidnim efektima, npr. kalcijum-cijanamidom.

Uzorkovanje izbegavati u toku ili neposredno nakon dugih perioda suše (dužih od 30 dana), ili zadržavanja vode. Za preorana zemljišta uzimati uzorke sa dubine od 0 cm do 20 cm. Za travnjake (pašnjake) ili druga zemljišta koja nisu duže vreme orana (najmanje jednu sezonu), maksimalna dubina uzorkovanja može biti nešto viša od 20 cm, npr. do 25 cm).

Uzorke zemljišta transportovati u odgovarajućim posudama i temperaturnim uslovima koji omogućavaju nepromenjivost svojstva zemljišta u toku transporta.

*1.6.3.2. Skladištenje*

Poželjno je ispitivati uzorke zemljišta neposredno nakon uzorkovanja. Ukoliko se uzorci ne mogu odmah ispitivati, skladište se u mraku na temperaturi od 4° C ± 2° C, maksimum tri meseca. U toku skladištenja obezbediti aerobne uslove. Ako se uzorci zemljišta uzimaju sa mesta gde je zemljište smrznuto najmanje tri meseca u toku godine, razmotriti skladištenje uzorka na temperaturi od - 18°C. Mikrobiološka biomasa skladištenih uzoraka zemljišta meri se pre početka svakog ispitivanja, a sadržaj ugljenika u biomasi je najmanje 1% ukupnog organskog ugljenika u zemljištu (videti odeljak 1.6.2. ove metode).

**1.6.4. Rukovanje i priprema uzoraka zemljišta za ispitivanje**

*1.6.4.1. Predinkubacija*

Ako su uzorci zemljišta skladišteni (videti odeljak 1.6.3.2. ove metode), preporučuje se predinkubacija u trajanju od 2 do 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage u uzorcima u toku predinkubacije da budu približni zahtevima ispitivanja (videti odeljak 1.6.4.2. i 1.7.1.3. ove metode).

*1.6.4.2. Fizička i hemijska svojstva*

Uzorci zemljišta se ručno čiste od velikih predmeta (npr. kamenje, delovi biljaka, itd) i mokro prosejavaju bez suvišnog sušenja na čestice veličine manje ili jednake od 2 mm. Sadržaj vlage u uzorku zemljišta podesiti destilovanom ili dejonizovanom vodom na vrednost između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode.

**1.6.5. Priprema ispitivane supstance za ispitivanje na uzorcima zemljišta**

Ispitivana supstanca se obično primenjuje uz upotrebu nosača. Nosač može biti voda (za supstance rastvorljive u vodi) ili inertni materijal poput finog kvarcnog peska (veličina čestica: 0,1 mm do 0,5 mm). Treba izbegavati upotrebu tečnih nosača, osim vode (npr. organski rastvarači kao aceton, hloroform) s obzirom na to da deluju negativno na mikrofloru. Ukoliko se koristi pesak kao nosač, može se prekriti sa ispitivanom supstancom rastvorenom ili suspendovanom u odgovarajući rastvarač. U takvim slučajevima, rastvarač ukloniti isparavanjem pre mešanja sa zemljištem. Za optimalnu distribuciju ispitivane supstance u zemljištu, preporučuje se odnos od 10 g peska po kilogramu zemljišta (suve težine). Kontrolni uzorci se tretiraju samo sa ekvivalentnom količinom vode, odnosno kvarcnog peska.

Kod ispitivanja isparljivih supstanci izbegavati gubitke u toku ispitivanja i omogućiti njenu homogenu raspodelu u zemljištu (npr. ispitivanu supstancu injektirati u zemljište na nekoliko mesta).

**1.6.6. Koncentracije ispitivane supstance**

Ako se ispituju sredstva za zaštitu bilja ili druge hemikalije sa predvidljivim koncentracijama u životnoj sredini koristiti najmanje dve koncentracije ispitivane supstance. Niža koncentracija odgovara najmanje maksimalnoj količini ispitivane supstance za koju se očekuje da će dospeti do zemljišta u realnim uslovima, dok je viša koncentracija umnožak niže koncentracije. Koncentracije ispitivane supstance dodate uzorcima zemljišta izračunavaju se uz pretpostavku da je ona ravnomerno raspodeljena do dubine od 5 cm i da je gustina zemljišta 1,5. Za agrohemikalije koje se primenjuju direktno na zemljište, ili za hemikalije za koje se može predvideti količina koja dospeva do zemljišta, preporučene koncentracije za ispitivanje su PEC i koncentracije pet puta veće od vrednosti PEC. Supstance koje će biti primenjene na zemljište više puta u jednoj sezoni ispitivati u koncentracijama dobijenim množenjem vrednosti PEC sa maksimalnim brojem predviđenih primena. Ipak, viša koncentracija ne sme biti veća od desetostruke vrednosti najveće primenjene koncentracije po pojedinačnoj primeni.

Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije. Koristi se geometrijska serija od najmanje pet koncentracija ispitivane supstance. Koncentracije ispitivane supstance pokrivaju opseg potreban za određivanje ECx vrednosti.

*1.7. IZVOĐENJE ISPITIVANJA*

**1.7.1. Uslovi izloženosti**

*1.7.1.1. Ispitivanje i kontrolne grupe*

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zemljišta se deli u tri uzorka jednake težine. Dva uzorka se mešaju sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a treći sa nosačem bez ispitivane supstance (kontrola). Preporučuju se minimalno tri ponavljanja za svaki uzorak, sa i bez ispitivane supstance. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, zemljište se deli u šest uzoraka jednake težine. Pet uzoraka se meša sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a šesti sa nosačem bez ispitivane supstance. Preporučaju se tri ponavljanja po svakom uzorku, sa i bez ispitivane supstance. Treba omogućiti homogenu raspodelu supstance u ispitivanim uzorcima zemljišta. Tokom mešanja izbegavati presovanje ili gnječenje zemljišta.

*1.7.1.2. Inkubacija uzoraka zemljišta*

Razlikuju se dva načina inkubacija uzoraka zemljišta zavisno od toga da li su u pitanju jedinstveni uzorci svakog ispitivanog i svakog kontrolnog uzorka zemljišta ili serije pojedinačnih poduzoraka jednake veličine za ispitivane i za kontrolne uzorke zemljišta. U slučaju isparljivih supstanci ispitivanje, ipak, izvesti samo sa serijama pojedinačnih poduzoraka. Kada se zemljište inkubira kao jedan jedinstveni uzorak, pripremaju se velike količine zemljišta za ispitivane i kontrolne grupe i po potrebi uzimaju se poduzorci i analiziraju. Količina inicijalno pripremljenih uzoraka za eksperimentalne i kontrolne grupe zavisi od veličine poduzoraka, broja ponavljanja i predviđenog maksimalnog broja uzorkovanja. Zemljišta inkubirana kao jedinstveni uzorak dobro promešati pre uzimanja poduzoraka. Kada se uzorci inkubiraju u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta, osnovni uzorak za ispitivane i kontrolne uzorke deli se na traženi broj poduzoraka i oni se koriste po potrebi. U ispitivanjima gde se može očekivati više od dva uzorkovanja, obezbediti dovoljan broj poduzoraka koji može da bude dovoljan za sva ponavljanja i svako uzorkovanje. Treba uraditi najmanje tri ponavljanja po koncentraciji ispitivane supstance i inkubirati u aerobnim uslovima (videti odeljak 1.7.1.1. ove metode). Tokom svih ispitivanja, koristiti adekvatne posude koje onemogućavaju razvijanje anaerobnih uslova. U slučaju isparljivih supstanci, ispitivanje se izvodi samo sa serijom pojedinačnih poduzoraka.

*1.7.1.3. Uslovi i trajanje ispitivanja*

Ispitivanje se vrši u mraku na temperaturi 20° C ± 2° C. Sadržaj vlage u uzorcima zemljišta održavati između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode u zemljištu (videti odeljak 1.6.4.2. ove metode) sa odstupanjima od ± 5%. Po potrebi, može se dodavati destilovana, dejonizovana voda.

Minimalno trajanje ispitivanja je 28 dana. Ako se ispituju agrohemikalije, porede se količine nastalog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika u ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu. Ako se 28. dana ove vrednosti razlikuju za više od 25% ispitivanje se nastavlja dok se ne postigne razlika ≤ 25% ili maksimalno do 100 dana, zavisno koji uslov se pre ispuni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivanje se prekida nakon 28 dana. Tada se određuju količine nastalog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika u ispitivanim i kontrolnim uzorcima zemljišta i izračunava ECx vrednost.

**1.7.2. Uzorkovanje i analiza zemljišta**

*1.7.2.1. Šema uzorkovanja zemljišta*

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, određuje se brzina glukozom indukovane respiracije u uzorcima zemljišta na početku ispitivanja, 7, 14. i 28. dana. Ako je potrebno produžiti ispitivanje, obaviti dodatna merenja svakih 14 dana nakon 28. dana.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituje se najmanje pet koncentracija ispitivane supstance i određuje se brzina glukozom indukovane brzine respiracije u uzorcima zemljišta na početku (dan 0) i na kraju perioda izlaganja (28. dan). Ukoliko se pokaže potrebnim dodatno merenje se može obaviti sredinom tog perioda, npr. sedmog dana. Podaci dobijeni 28. dana koriste se u određivanju ECx vrednosti za datu hemikaliju. Podaci dobijeni iz kontrolnih uzoraka na početku ispitivanja mogu koristiti u određivanju inicijalnih količina metabolički aktivne mikrobiološke biomase u zemljištu**12**.

*1.7.2.2. Merenje glukozom indukovane brzine respiracije*

Glukozom indukovana brzina respiracije u svakom ponavljanju za uzorke zemljišta ispitivane i kontrolne grupe određuje se pri svakom vremenu uzorkovanja. Uzorci zemljišta se mešaju sa dovoljnom količinom glukoze da se izazove maksimalni respiratorni odgovor. Količina glukoze potrebna za izazivanje maksimalnog respiratornog odgovora za dato zemljište može se odrediti u preliminarnom ispitivanju ispitujući seriju koncentracija glukoze**14**. Za peskovita zemljišta sa sadržajem organskog ugljenika 0,5% do 1,5%, obično je dovoljno 2.000 mg do 4.000 mg glukoze po kilogramu suve težine zemljišta. Glukoza se može samleti u prah sa čistim kvarcnim peskom (10 g peska/kg suve težine zemljišta) i homogenizovati sa zemljištem.

Uzorci zemljišta obogaćeni glukozom inkubiraju se u odgovarajućoj posudi za merenje brzine respiracije u kontinuitetu, ili na svaki sat, ili na svaka dva sata (videti odeljak 1.6.1. ove metode), na temperaturi 20° C ± 2° C. Količina oslobođenog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika meri se narednih 12 sati, a merenje početi što je pre moguće, poželjno 1 do 2 sata nakon dodavanja glukoze. Ukupna količine oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika u toku 12 sati meri se i određuje srednja brzina respiracije.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zabeležiti količinu nastalog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika za sve uzorke ispitivane grupe, a srednje vrednosti za sva ponavljanja navesti u tabelarnoj formi. Rezultate proceniti odgovarajućim i opšte prihvaćenim statističkim metodama (npr. F-test, nivo značaja 5%). Brzina glukozom indukovane respiracije se izražava u mg ugljen-dioksida/kg suve težine zemljišta/h ili mg kiseonika/suve težine/h. Srednja vrednost brzine nastajanja ugljen-dioksida ili srednja vrednost brzine potrošnje kiseonika u svakoj ispitivanoj grupi poredi se sa kontrolnom grupom i računa se procenat odstupanja od vrednosti u kontroli.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, određuju se količine oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika za svaki uzorak ispitivane grupe i pravi se kriva dozne zavisnosti za procenu ECx vrednosti. Brzina glukozom indukovane respiracije (npr. mg CO2/kg suve težine zemljišta/h ili mg kiseonika/suve težine zemljišta/h) u ispitivanim uzorcima nakon 28 dana poredi se sa vrednostima u kontroli. Iz tih podataka računa se procenat vrednosti inhibicije za svaku koncentraciju ispitivane supstance. Ovi rezultati prikazuju se grafički u funkciji koncentracija ispitivane supstance, a za određivanje ECx vrednosti koriste se statističke procedure. Intervali poverenja (*p* = 0,95) za izračunate ECx vrednosti i putem standardnih procedura**15,16,17**.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Kada se procenjuju rezultati ispitivanja sa agrohemikalijama i kad je razlika u brzini respiracije između prve ispitivane grupe u seriji (maksimalna predviđena koncentracija) i kontrole ≤ 25% u bilo kom vremenu uzorkovanja nakon 28. dana, za date hemikalije se može oceniti da nemaju dugoročni uticaj na transformaciju ugljenika u zemljištu. Kada se procenjuju rezultati dobijeni ispitivanjem supstanci koje nisu agrohemikalije, koriste se EC50, EC25, odnosno EC10 vrednosti.

**3. IZVEŠTAJ**

Izveštaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju korišćenog zemljišta, uključujući:

- geografske odrednice mesta (geografska širina i dužina);

- podatke o istoriji mesta (npr. biljni pokrivač, tretmani sredstvima za zaštitu bilja, tretmani đubrivima, kontaminacije usled nesrećnog slučaja itd);

- upotreba zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd);

- dubina uzorkovanja (cm);

- sadržaj peska/mulja/gline (% suve težine);

- pH vrednost (u vodi);

- sadržaj organskog ugljenika (% suve težine);

- sadržaj azota (% suve težine);

- jonsko izmenjivački kapacitet (mmol/kg);

- početna biomasa mikroorganizama u procentima u odnosu na ukupan organski ugljenik;

- literatura vezano za sve metode korišćene za određivanje svakog parametra;

- svi podaci u vezi sa sakupljanjem i skladištenjem uzoraka zemljišta;

- detalji o predinkubaciji, ako postoje;

2) podatke o ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i gde je bitno, fizička i hemijska svojstva;

- podaci za identifikaciju hemikalije, uključujući strukturnu formulu i stepen čistoće (npr. za sredstva za zaštitu bilja, procenat aktivnog sastojka), sadržaj azota.

3) podatke o uslovima ispitivanja:

- opis obogaćivanja zemljišta organskim supstratom;

- broj koncentracija ispitivane supstance i gde je prikladno, objašnjenje za izbor datih koncentracija;

- opis načina uvođenja ispitivane supstance u zemljište;

- temperatura inkubacije;

- sadržaj vlage u zemljištu na početku i u toku ispitivanja;

- korišćena metoda inkubacije zemljišta (jedinstven uzorak ili serija pojedinačnih poduzoraka);

- broj ponavljanja;

- broj uzorkovanja;

4) podatke o rezultatima:

- metoda i oprema za merenje brzine respiracije;

- tabelarni podaci uključujući pojedinačne i srednje vrednosti za količinu ugljen-dioksida ili kiseonika;

- varijansa u kontrolnim i eksperimentalnim grupama;

- objašnjenje korekcija u izračunavanju, ukoliko je bitno;

- procenat razlike glukozom indukovane brzine respiracije pri svakom vremenu uzorkovanja, ili, ukoliko je prikladno EC50 sa 95% intervalima poverenja, druge ECx vrednosti (npr. EC25 ili EC10) sa intervalima poverenja i grafički prikaz krive dozne zavisnosti;

- statistička obrada rezultata, gde je prikladno;

- sve dodatne podatke i opažanja potrebne za za tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2. BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3. EPA, (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4. SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5. OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

6. ISO 10381-6, (1993) Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7. Anderson, J.P.E., (1987) Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in 'Pesticide Effects on Soil Microflora'. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

8. Anderson, J.P.E., (1982) Soil Respiration, in 'Methods of Soil Analysis - Part 2: Chemical and Microbiological Properties'. Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

9. ISO 11266-1, (1993) Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10. ISO 14239, (1997E) Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11. Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G., (1989) Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

12. ISO 14240-1, (1997) Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrateinduced respiration method.

13. ISO 14240-2, (1997) Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigationextraction method.

14. Malkomes, H.-P., (1986) Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

15. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

16. Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

17. Finney D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

**C.23. AEROBNA I ANAEROBNA TRANSFORMACIJA U ZEMLJIŠTU**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 307 (2002).

*1.1. UVOD*

Ova metoda bazira se na postojećim smernicama**1,2,3,4,5,6,7,8,9**. Opisana metoda osmišljena je za procenu aerobne i anaerobne transformacije hemikalija u zemljištu. Ispitivanja se obavljaju da bi se utvrdila: 1. brzina transformacije ispitivane supstance i 2. priroda i brzina stvaranja i razlaganja proizvoda transformacije kojima bi biljke i zemljišni organizmi mogli biti izloženi. Ovakva ispitivanja su potrebna za hemikalije koje se primenjuju direktno na zemljište ili koje dospevaju u zemljište. Rezultati takvih laboratorijskih ispitivanja mogu se koristiti i pri razvijanju protokola uzimanja uzoraka i analize za srodna istraživanja u ovom području.

Aerobne i anaerobne studije sa jednim tipom zemljišta obično su dovoljne za procenu puteva transformacije**8,10,11**. Brzina transformacije određuje se u najmanje tri dodatna tipa zemljišta**8,10**.

Na OECD radionici o izboru zemljišta i sedimenta**10** dogovoren je broj i tip zemljišta koja se koriste u ovoj metodi ispitivanja. Tipovi ispitivanih zemljišta predstavljaju uslove u životnoj sredini gde će se hemikalije upotrebljavati ili ispustiti. Na primer, hemikalije koje bi se mogle ispuštati u suptropskim i tropskim klimatima ispitivati na ferasolu i nitosolu (FAO sistem). Date su i preporuke u vezi sakupljanja, rukovanja i skladištenja uzoraka zemljišta, prema ISO standardu**15.** Upotreba pirinčanih polja se podjednako uzima u obzir u ovoj metodi.

*1.2. DEFINICIJE*

Ispitivana supstanca jeste bilo koja supstanca, izvorna supstanca ili proizvodi transformacije.

Proizvodi transformacija jesu sve supstance koje su rezultat biotičkih i abiotičkih reakcija transformacija ispitivane supstance, uključujući CO2 i vezane rezidue.

Vezane rezidue jesu jedinjenja u zemljištu, biljkama ili životinjama koje se zadržavaju u matriksu u obliku izvorne supstance ili njenih metabolita/proizvoda transformacije posle ekstrakcije. Metoda ekstrakcije ne sme bitno menjati supstance ili strukturu matriksa. Priroda veze se može delimično objasniti metodama ekstrakcije koje menjaju matriks i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Na ovaj način su do danas identifiovani kovalentna jonska i sorptivna veza i molekulske zamke. Vezivanje rezidua znatno smanjuje biodostupnost i bioraspoloživost**12** (izmenjen IUPAC 1984 izveštaj**13**).

Aerobna transformacije jesu reakcije koje se odvijaju u prisustvu molekulskog kiseonika**14**.

Anaerobna transformacije jesu reakcije koje se odvijaju bez prisustva molekulskog kiseonika**14**.

Zemljište jeste mešavina mineralnih i organskih hemijskih sastojaka koje čine jedinjenja sa visokim procentom ugljenika i azota, kao i jedinjenja velikih molekulskih masa, u kojima uglavnom žive mikroorganizmi. Zemljište može biti u jednom od dva stanja:

- neporemećeno, kako se vremenom razvilo, u karakterističnim horizontima i raznim tipovima zemljišta;

- poremećeno, kakvo se obično nalazi na oranicama, ili kakvo se javlja u uzorcima koji se iskopaju i koriste u ovoj metodi ispitivanja**14**.

Mineralizacija jeste potpuno razlaganje organske materije na CO2 i H2O u aerobnim uslovima i do CH4, CO2 i H2O u anaerobnim uslovima. U ovoj metodi kad se koristi jedinjenje obeleženo ugljenikom C14, mineralizacija jeste ekstenzivno razlaganje u toku kojeg označeni ugljenikov atom oksiduje uz otpuštanje određene količine C14O214.

Poluživot (t0,5) jeste vreme potrebno za transformaciju 50% ispitivane supstance, u slučajevima kada se transformacija može opisati kinetikom prvog reda i ne zavisi od početne koncentracije.

Vreme nestajanja 50 (u daljem tekstu: DT50) jeste vreme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 50%, razlikuje se od poluživota t0,5 kada transformacija ne sledi kinetiku prvog reda.

Vreme nestajanja 75 (u daljem tekstu DT75) jeste vreme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 75%.

Vreme nestajanja 90 (u daljem tekstu: DT90) jeste vreme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 90%.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se koriste za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda transformacije spektroskopskim i hromatografskim metodama.

*1.4. PRIMENLJIVOST METODE*

Metoda je primenljiva na supstance (neobeležene ili obeležene) za koje je dostupna dovoljno precizna i osetljiva analitička metoda. Primenljiva je na slabo isparljiva jedinjenja, neisparljiva jedinjenja, jedinjenja rastvorljiva u vodi ili jedinjenja nerastvorljiva u vodi. Metoda ispitivanja se ne primenjuje na jedinjenja koja su jako isparljiva iz zemljišta (npr. fumiganti, organski rastvarači) i zato se ne mogu držati u zemljištu u ispitivanim uslovima ove metode.

*1.5. PODACI O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Neobeležene ili obeležene supstance mogu se koristiti za merenje brzine transformacije. Za proučavanje puteva transformacije i određivanja masenog balansa potreban je obeleženi materijal. Obeležavanje ugljenikom C14 se preporučuje, ali upotreba drugih izotopa kao što su C13, N15, H3, P32 takođe može biti od koristi. Molekul označiti u što je moguće stabilnijem delu. Čistoća ispitivane supstance je najmanje 95%.

Pre ispitivanja aerobne i anaerobne transformacije u zemljištu, o ispitivanoj supstanci su dostupni podaci:

- rastvorljivost u vodi (Metoda A.6. koja je data u ovom pravilniku);

- rastvorljivost u organskim rastvaračima;

- napon para (Metoda A.4. koja je data u ovom pravilniku) i Henrijeva konstanta;

- koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku);

- hemijska stabilnost u mraku (hidroliza) (Metoda C.7. koja je data u ovom prilogu);

- pKa, ako je molekul sklon protonaciji i deprotonaciji (OECD smernice 112)**16**.

Ostali korisni podaci mogu uključivati podatke o toksičnosti ispitivane supstance za zemljišne mikroorganizme (Metode C.21. i C.22. koje su date u ovom prilogu)**16**.

Analitičke metode (uključujući metode ekstrakcije i čišćenja) za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivane supstance i njenih proizvoda transformacije treba da budu dostupne.

*1.6. PRINCIP METODE*

Uzorci zemljišta tretiraju se ispitivanom supstancom i inkubiraju u mraku u bocama tipa biometra ili u protočnim sistemima u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (pri konstantnoj temperaturi i vlažnosti zemljišta). Nakon predviđenih vremenskih intervala, uzorci zemljišta se ekstrahuju i analiziraju na izvorne supstance i proizvode transformacije. Isparljivi proizvodi se takođe skupljaju za analizu koristeći potrebne uređaje za adsorpciju. Koristeći materijal obeležen sa C14, mogu se izmeriti razne brzine mineralizacije ispitivane supstance, hvatanjem C14O2 koji se razvio masenim balansom, uključujući stvaranje veznih rezidua zemljišta.

*1.7. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.7.1. Efikasnost analitičke tehnike**

Ekstrakcija i analiza najmanje dva uzorka zemljišta neposredno nakon dodavanja ispitivane supstance daje prvu naznaku o ponovljivosti analitičke metode i ujednačenosti postupka primene za ispitivanu supstancu. Efikasnost analitičke tehnike u kasnijim fazama ispitivanja određuje se iz masenih balansa. Efikasnost analitičke tehnike je u opsegu od 90% do 110% za obeležene hemikalije**8** i od 70% do 110% za neobeležene hemikalije**3**.

**1.7.2. Ponovljivost i osetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode (isključujući početnu efikasnost ekstrakcije) u kvantifikovanju ispitivane supstance i proizvoda transformacije može se proveriti analizama istog ekstrakta zemljišta u duplikatu, inkubiranog dovoljno dugo da bi se stvorili proizvodi transformacije.

Granica detekcije (Limit of Detection, u daljem tekstu: LOD) analitičke metode za ispitivanu supstancu i za proizvode transformacije je najmanje 0,01 mg/kg zemljišta (kao ispitivana supstanca) ili 1% primenjene doze, koja doza je niža. Granica kvantifikacije (Limit of Quantification, u daljem tekstu: LOQ) takođe treba da bude određena.

**1.7.3. Preciznost podataka o transformaciji**

Regresiona analiza koncentracija ispitivane supstance u funkciji vremena daje adekvatne podatke o pouzdanosti transformacione krive i omogućava izračunavanje intervala poverenja za poluživot (ako je primenljiva kinetika pseudo prvog reda), ili DT50 vrednosti i ako su primenljive, DT75 i DT90 vrednosti.

*1.8. OPIS METODE*

**1.8.1. Oprema i hemijski reagensi**

Inkubacioni sistemi se sastoje od statičkih zatvorenih sistema ili adekvatnih protočnih sistema**7,17**. Primeri odgovarajućih aparata za protočnu inkubaciju i boca tipa biometara prikazani su na slikama 1 i 2. Oba tipa inkubacionih sistema imaju prednosti i ograničenja**7,17**.

Potrebna je standardna laboratorijska oprema, a posebno:

- analitički instrumenti kao što su GLC, HPLC, TLC, uključujući odgovarajuće sisteme za detekciju i za analizu radioizotopima obeleženih, ili neobeleženih supstanci, ili oprema za metodu inverznog razređenja izotopa;

- instrumenti za identifikaciju (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, itd);

- tečni scintilacioni brojač;

- oksidator za spaljivanje radioaktivnog materijala;

- centrifuga;

- aparatura za ekstrakciju (na primer, kivete za centrifugu kod hladne ekstrakcije i Soxhlet aparatura za kontinuiranu ekstrakciju pod refluksom);

- instrumenti za koncentrovanje rastvora i ekstrakta (npr. rotirajući isparivač);

- vodeno kupatilo;

- mehanička mešalica (npr. mašina za mešanje, rotirajući mikser).

Hemijski reagensi koji se koriste uključuju na primer:

- NaOH, analitičke čistoće, 2 mol/dm3, ili druge adekvatne baze (npr. KOH, etanolamin);

- H2SO4, analitičke čistoće, 0,05 mol/dm3;

- etilenglikol, analitičke čistoće;

- čvrsti materijali za apsorpciju kao što su krečnjak i poliuretanski čepovi;

- organski rastvarači, analitičke čistoće, kao što su aceton, metanol itd.;

- scintilacione tečnosti.

**1.8.2. Nanošenje ispitivane supstance**

Za dodavanje i raspodelu u zemljištu, ispitivana supstanca se može rastvoriti u vodi (dejonizovanoj ili destilovanoj), ili kada je potrebno, u minimalnim količinama acetona ili drugog organskog rastvarača**6** u kome je ispitivana supstanca dovoljno rastvorljiva i stabilna. Količina izabranog rastvarača ne sme bitnije da utiče na mikrobiološku aktivnost zemljišta (videti odeljke 1.5. i 1.9.2. do 1.9.3. ove metode). Upotrebu rastvarača koji sprečavaju mikrobiološku aktivnost zemljišta, kao što su hloroform, dihlormetan i ostali halogeni rastvarači, izbegavati.

Ispitivana supstanca se može dodati i kao čvrsta supstanca, npr. mešana sa kvarcnim peskom**6** ili u malim poduzorcima ispitivanog zemljišta koji su osušeni na vazduhu i sterilisani. Ako se ispitivana supstanca dodaje sa rastvaračem, rastvarač upariti pre nego što se poduzorak doda originalnom nesterilnom uzorku zemljišta.

U slučaju hemikalija, čiji je glavni put unosa u zemljište kanalizacioni mulj, ili njihova upotreba u poljoprivredi, ispitivanu supstancu prvo dodati u mulj, koji se potom uvodi u uzorak zemljišta (videti odeljke 1.9.2. i 1.9.3. ove metode).

Ne preporučuje se rutinska upotreba formulisanih proizvoda. Za slabo rastvorljive supstance, upotreba formulisanog materijala može biti primerena alternativa.

**1.8.3. Zemljišta**

*1.8.3.1. Izbor zemljišta*

Za određivanje puta transformacije može se koristiti reprezentativno zemljište: peskovita ilovača, muljevita ilovača, ilovača ili pesak sa ilovačom (po FAO i USDA klasifikaciji**18**) sa pH od 5,5 do 8,0. Preporučuje se udeo organskog ugljenika od 0,5% do 2,5% i mikrobiološke biomase od najmanje 1% od ukupnog organskog ugljenika**10**.

Za ispitivanje brzine transformacije koristiti najmanje tri dodatna tipa zemljišta koji predstavljaju opseg relevantnih tipova. Zemljišta treba da variraju u udelu organskog ugljenika, pH vrednosti, udelu gline i mikrobiološke biomase**10**.

Sve vrste zemljišta okarakterisati barem po teksturi (% peska, % mulja, % gline, po FAO i USDA klasifikaciji**18**), pH vrednosti, katjonskom izmenjivačkom kapacitetu, sadržaju organskog ugljenika, gustini, kapacitetu zadržavanja**XXXV** vode i mikrobiološke biomase (samo za aerobna ispitivanja). Dodatni podaci o karakteristikama zemljišta mogu biti korisni kod tumačenja rezultata. Za određivanje karakteristika zemljišta mogu se koristiti metode navedene u literaturi**19,20,21,22,23**. Mikrobiološku biomasu odrediti koristeći metodu**25,26** supstrat - indukovanog disanja (SIR) ili alternativnim metodama**20**.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXV** Kapacitet zadržavanja vode u zemljištu se može meriti kao poljski kapacitet vlažnosti, kao kapacitet zadržavanja vode ili jačina upijanja vode (pF). Za objašnjenja videti Deo drugi ove metode. U izveštaju navesti ako su karakteristike retencije vode i gustoća mase zemljišta određeni u neporemećenim ili poremećenim (obrađenim) uzorcima.

*1.8.3.2. Sakupljanje, rukovanje i skladištenje zemljišta*

Treba raspolagati detaljnim podacima o istorijatu lokacije na terenu odakle se skupljaju uzorci ispitivanog zemljišta. Detalji uključuju tačnu lokaciju, biljni pokrivač, tretiranje hemikalijama, tretman sa organskim i mineralnim đubrivima, dodatak bioloških materijala ili druge kontaminacije. Zemljišta tretirana sa ispitivanom supstancom ili njenim strukturnim analozima, u prethodne četiri godine ne smeju se koristiti u ispitivanju transformacije**10,15**.

Zemljište za ispitivanje je sveže skupljeno sa polja (od horizonta A ili 20 cm površinskog sloja) sa sadržajem vode koje olakšava prosejavanje. Za sva zemljišta osim onih sa pirinčanih polja, uzorke ne bi trebalo uzimati u toku ili odmah nakon dugih perioda (> 30 dana) suše, smrzavanja ili plavljenja**14**. Uzorci se transportuju na način koji minimalizuje promene u sadržaju vode u zemljištu i drže se u mraku, u prisustvu vazduha, koliko god je moguće. Labavo vezana polietilenska vreća je obično dobra za ovu svrhu.

Zemljište obraditi što je ranije moguće nakon uzimanja uzoraka. Vegetaciju, veću faunu zemljišta i kamenje ukloniti pre prosejavanja zemljišta kroz sito promera 2 mm koje uklanja manje kamenje, faunu i ostatke bilja. Treba izbegavati jače sušenje i drobljenje zemljišta pre prosejavanja**15**.

Kad je uzimanje uzoraka otežano, zimi u polju (zemljište je zamrznuto ili prekriveno slojevima snega), uzorak se može uzeti sa gomile zemljišta uskladištenog u stakleniku pod biljnim pokrivačem (npr. trava ili mešano trava - detelina). Za ispitivanja se strogo preporučuje upotreba uzoraka zemljišta koji su neposredno sakupljeni sa polja, ali ako se obrađeno i procesuirano zemljište skladišti pre početka ispitivanja, potrebno je da uslovi skladištenja biti adekvatni i samo na ograničeno vreme (temperatura od 4° C ±2° C, na maksimalno 3 meseca) da bi se održala mikrobiološka aktivnost**XXXVI**. Detaljnija uputstva o sakupljanju, rukovanju i skladištenju zemljišta koja se koriste u metodi ispitivanja transformacije data su u literaturi**8,10,15,26,27**.

Pre ispitivanja zemljište predinkubirati da bi se dopustilo klijanje i uklanjanje semena kako bi se ponovno uspostavila ravnoteža mikrobiološkog metabolizma, prateći promene od uzorkovanja, ili uslova skladištenja do uslova inkubacije. Predinkubacioni period između 2 i 28 dana u toku koga se aproksimiraju uslovi temperature i vlage konkretne metode ispitivanja je opšte prihvaćen**15**. Vreme skladištenja i predinkubacije zajedno ne traje duže od tri meseca.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXVI** Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da se zemljišta iz umerenih zona mogu skladištiti na temperaturi -20 °C, više od tri meseca**28, 29**, bez značajnog gubitka mikrobiološke aktivnosti.

*1.9. TOK ISPITIVANJA*

**1.9.1. Uslovi u toku ispitivanja**

*1.9.1.1. Temperatura*

Tokom čitavog ispitivanja, uzorke zemljišta inkubirati u mraku na konstantnoj temperaturi reprezentativnoj za uslove klime gde će se ispitivana supstanca upotrebljavati ili ispuštati. Temperatura od 20° C ± 2° C preporučuje se za sve ispitivane supstance koje mogu dopreti do zemljišta u umerenoj klimi. Temperatura se prati.

Za hemikalije koje se primenjuju ili ispuštaju u hladnijoj klimi (recimo u severnim zemljama, u toku jeseni/zime) inkubirati dodatne uzorke zemljišta, ali na nižoj temperaturi (10° C ± 2° C).

*1.9.1.2. Sadržaj vlage*

Za ispitivanje transformacije u aerobnim uslovima, sadržaj vlage u zemljištu**XXXVII** prilagoditi i održati na pF između 2,0 i 2,53. Sadržaj vlage u zemljištu se izražava kao masa vode po masi suvog zemljišta i redovno se kontroliše (npr. u intervalima od 2 nedelje) merenjem boca za inkubaciju, a gubitak vode nadoknaditi njenim dodavanjem (najbolje sterilnom, filtriranom vodovodnom vodom). Treba paziti da se pri dodavanju vode spreče ili minimalizuju gubici ispitivane supstance, odnosno proizvoda transformacije isparavanjem i/ili fotodegradacijom (ako se desi).

Za ispitivanje transformacije u anaerobnim uslovima i uslovima pirinčanih polja, zemljište da bude saturisano vodom, plavljenjem.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXVII** Zemljište da bude ni previše vlažno ni previše suvo da bi se održala adekvatna aeracija i ishrana zemljišne mikroflore. Sadržaj vlage za optimalni mikrobiološki rast je u rasponu od 40% do 60% kapaciteta zadržavanja vode (water holding capacity, WHC) i od 0,1 bara do 0,33 bara. Taj raspon je ekvivalentan rasponu pF od 2,0 do 2,5 jedinica. Tipičan sadržaj vlage raznih tipova zemljišta dat je u Delu trećem ove metode.

*1.9.1.3. Aerobni uslovi inkubacije*

U protočnim sistemima, aerobni uslovi se održavaju isprekidanim ispiranjem ili kontinuiranim provetravanjem vlažnim vazduhom. U bocama tipa biometra, razmena vazduha se postiže difuzijom.

*1.9.1.4. Sterilni aerobni uslovi*

Da bi se dobili podaci o značaju abiotičke transformacije ispitivane supstance, uzorci zemljišta se mogu sterilisati (za metode sterilizacije videti u literaturi16,29), tretirani sterilnom ispitivanom supstancom (npr. dodavanje rastvora kroz sterilni filtar) i provetravati ovlaženim, sterilnim vazduhom kako je opisano u odeljku 1.9.1.3. ove metode. Za zemljišta sa pirinčanih polja, voda i zemljište da budu sterilisani, a inkubacija se obavlja kako je opisano u odeljku 1.9.1.6. ove metode.

*1.9.1.5. Anaerobni uslovi inkubacije*

Da bi se uspostavili i održali anaerobni uslovi, zemljište koje je tretirano sa ispitivanom supstancom i inkubirano u aerobnim uslovima 30 dana ili u toku poluživota ili DT50 (u zavisnosti od toga koje je vreme kraće) stavlja se u vodu (1 cm do 3 cm sloja vode) i inkubacioni sistem se ispere inertnim gasom (npr. azotom ili argonom)**XXXVIII**. Ispitivani sistem omogućava merenja poput pH vrednosti, koncentracije kiseonika i redoks potencijala i sadrži aparaturu za hvatanje isparljivih proizvoda. Sistem tipa biometra je zatvoren da se izbegne ulazak vazduha difuzijom.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXVIII** Aerobni uslovi su dominantni u površinskom i čak u pod-površinskom zemljištu, kao što je vidljivo iz istraživačkog projekta sponzorisanog od EU [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Anaerobni uslovi se mogu pojaviti samo povremeno, tokom poplava nakon jakih kiša, ili kad se uspostavljaju uslovi posebnog navodnjavanja u pirinčanim poljima.

*1.9.1.6. Uslovi inkubacije za zemljišta sa pirinčanih polja*

Da bi se ispitala transformacija u zemljištima pirinčanih polja, zemljište se plavi slojem vode od oko 1 cm do 5 cm i ispitivana supstanca se dodaje u vodenu fazu**9**. Preporučuje se dubina zemljišta od najmanje 5 cm. Sistem se aeriše u aerobnim uslovima. Vrednost pH, koncentraciju kiseonika i redoks potencijal vodenog sloja pratiti i navesti. Potreban je predinkubacioni period od najmanje dve nedelje pre početka ispitivanja transformacije (videti odeljak 1.8.3.2. ove metode).

*1.9.1.7. Dužina ispitivanja*

Ispitivanja brzine i puteva ne treba da budu duža od 120 dana**XXXIX, 3,6,8**, jer bi se nakon toga, vremenom, očekivalo smanjenje mikrobiološke aktivnosti, u veštačkom laboratorijskom sistemu, izolovanom od prirodnog nadopunjavanja. Ispitivanja se mogu produžiti na duže periode tamo gde je potrebno okarakterisati smanjenje ispitivane supstance i stvaranje i razlaganje glavnih proizvoda transformacije. (npr. 6 ili 12 meseci)**8**. Duže periode inkubacije obrazložiti u izveštaju o ispitivanju uz propratna merenja biomase u toku i na kraju ovih perioda.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XXXIX** Aerobna ispitivanja se mogu prekinuti mnogo pre 120 dana ako se za to vreme utvrde konačni put transformacije i postigne potpuna mineralizacija. Prekid ispitivanja je moguć posle 120 dana, ili kada se barem 90% ispitivane supstance transformiše, ali samo ako se formira najmanje 5% CO2.

**1.9.2. Tok ispitivanja**

Otprilike 50 g do 200 g zemljišta (suve mase) stavlja se u svaku inkubacionu bocu (videti Sliku 1 i 2 u Delu trećem ove metode) i zemljište se tretira ispitivanom supstancom, korišćenjem neke od metoda opisanih u odeljku 1.8.2. ove metode. Ako se koriste organski rastvarači za nanošenje ispitivane supstance, oni se uklone iz zemljišta isparavanjem. Zemljište se dobro promeša spatulom, odnosno boca se protrese. Ako se ispitivanje izvodi u uslovima pirinčanih polja, zemljište dobro promešati sa vodom nakon primene ispitivane supstance. Manje uzorke (npr. od 1 g) tretiranog zemljišta analizirati na ispitivanu supstancu da bi se proverila ravnomernost raspodele.

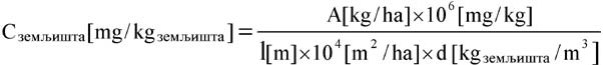
Ispitivana doza da bude usaglašena sa najvišom primenjenom dozom sredstva za zaštitu bilja preporučenom u uputstvu za upotrebu i ravnomerne primene na odgovarajućim dubinama u polju (u gornjih 10 cm sloja**XL** zemljišta). Na primer, za hemikalije koje se primenjuju na lišće ili zemljište, ali bez inkorporacije, 2,5 cm je prikladna dubina za izračunavanje koliko hemikalije dodati u svaku bocu. Za hemikalije unete u zemljište, prikladna dubina je ona navedena u uputstvima za upotrebu. Uopšteno, za hemikalije brzina primene se procenjuje prema najznačajnijem putu ulaska. Na primer, kad je glavni put ulaska preko kanalizacionog mulja, hemikaliju dozirati u mulj, u koncentraciji koja odražava očekivanu koncentraciju mulja, a količina dodatog mulja odražava uobičajeni mulj koji se dodaje poljoprivrednim zemljištima. Ako ova koncentracija nije dovoljno visoka da omogući identifikaciju glavnih proizvoda transformacije, mogla bi pomoći inkubacija odvojenih uzoraka zemljišta koji sadrže veći opseg, ali izbegavati prevelike količine koje utiču na mikrobiološke funkcije zemljišta (videti odeljke 1.5. i 1.8.2. ove metode).

Veći komad zemljišta (npr. 1 kg do 2 kg) može se tretirati ispitivanom supstancom, pažljivo pomešati u odgovarajućoj mešalici i podeliti u manje porcije od 50 g do 200 g u boce za inkubaciju (korišćenjem razvodnika). Manje alikvote (npr. 1 g) tretiranog zemljišta analizirati na ispitivanu supstancu da bi se proverila ravnomernost raspodele. Takva procedura ima prednosti jer dopušta ravnomerniju raspodelu ispitivane supstance u zemljištu.

Neobrađeni uzorci se takođe inkubiraju u istim uslovima (aerobnim) kao i uzorci tretirani ispitivanom supstancom. Ti uzorci se koriste za merenje biomase u toku i na kraju ispitivanja.

Kada se ispitivana supstanca primenjuje na zemljište rastvorena u organskim rastvaračima, uzorci zemljišta tretirani istom količinom rastvarača inkubiraju se u istim uslovima (aerobnim), kao i uzorci tretirani ispitivanom supstancom. Ovi uzorci se koriste za merenje biomase u početku, u toku i na kraju ispitivanja, da bi se proverili efekti rastvarača na mikrobiološku biomasu.

Boce koje sadrže tretirano zemljište se ili spajaju na protočne sisteme opisane na Slici 1, ili se zatvaraju apsorpcionom kolonom prikazanom na Slici 2 (videti Deo četvrti ove metode).

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XL** Izračunavanje početne koncentracije na bazi površine dato je jednačinom:  


Pri čemu:

Czemljišta jeste početna koncentracija u zemljištu (mg/kg);   
A jeste doza za primenu (mg/kg);  
l jeste debljina zemljišnog sloja u polju [m]; d = gustina suve zemljišne mase (kg/m3).  
Aproksimativno, doza primene od 1 kg/ha jeste približno 1 mg/kg zemljišne koncentracije u sloju od 10 cm (pretpostavljajući gustinu mase od 1 g/cm3).

**1.9.3. Uzimanje uzoraka i merenje**

Duple boce za inkubaciju uklanjaju se u odgovarajućim vremenskim intervalima i uzorci zemljišta ekstrahuju odgovarajućim rastvaračima različite polarnosti i analiziraju na ispitivanu supstancu, odnosno proizvode transformacije. Dobro osmišljeno ispitivanje uključuje dovoljno boca tako da se dve boce mogu odbaciti pri svakom uzimanju uzoraka. Rastvori za apsorpciju ili kruti materijali za apsorpciju uklanjaju se u različitim vremenskim intervalima (7-dnevni intervali u toku prvog meseca i 17-dnevni intervali nakon prvog meseca), u toku i na kraju inkubacije svakog uzorka zemljišta i analiziraju na isparljive produkte. Osim uzorka zemljišta uzetog neposredno nakon primene (uzorak, nultog dana) uključiti najmanje 5 dodatnih tačaka uzorkovanja. Vremenske intervale izabrati tako da se obrazac opadanja ispitivane supstance i obrasci stvaranja i razlaganja produkata transformacije mogu uspostaviti (npr. 0, 1, 3, 7. dan; 2, 3. nedelja; 1, 2, 3. mesec, itd).

Kada se koristi ispitivana supstanca označena ugljenikom C14, radioaktivnost koja se ne može ekstrahovati kvantifikovaće se spaljivanjem, a maseni balans će se izračunati za svaki interval uzorkovanja.

U slučaju anaerobne inkubacije i inkubacije navodnjavanih uzoraka, faza zemljišta i vode zajedno se analiziraju na ispitivanu supstancu i proizvode transformacije, ili se odvajaju filtracijom, ili centrifugom pre ekstrakcije i analize.

**1.9.4. Fakultativna ispitivanja**

Aerobna, nesterilna ispitivanja na dodatnim temperaturama mogu biti korisne za procenu uticaja temperature i vlage u zemljištu na brzinu transformacije ispitivane supstance, odnosno njenih proizvoda transformacije u zemljištu.

Dodatna karakterizacija radioaktivnosti koja se ne može ekstrahovati može se pokušati upotrebom, na primer superkritične tečne ekstrakcije.

**2. PODACI**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

Količine ispitivane supstance, proizvoda transformacije, isparljivih supstanci (samo u procentima) i supstanci koje se ne mogu ekstrahovati izražavaju se u procentu primenjene početne koncentracije i gde je prikladno, kao mg/kg zemljišta (na bazi suve mase zemljišta) za svaki interval uzorkovanja. Maseni balans se izražava kao procenat primenjene početne koncentracije za svaki interval uzorkovanja. Grafički prikaz koncentracija supstance u funkciji vremena omogućiće procenu poluživota ili DT50. Glavni proizvodi transformacije identifikuju se i njihove koncentracije se takođe prikazuju u funkciji vremena, da bi se pokazala brzina njihovog nastanka i raspada. Glavni proizvod transformacije je bilo koji proizvod koji predstavlja ≥ 10% primenjene doze, u bilo koje vreme u toku ispitivanja.

Isparljivi proizvodi koji se uhvate daju naznaku potencijala isparljivosti ispitivane supstance i njenih proizvoda transformacije iz zemljišta.

Preciznija određivanja poluživota ili DT50 vrednosti i ako je prikladno, DT75 i DT90 vrednosti postižu se primenom odgovarajućih kalkulacija pomoću kinetičkih modela. Poluživot ili DT50 vrednosti navode se u izveštaju zajedno sa opisom modela koji je korišćen, kao i redom kinetike i koeficijentom određivanja (r2). Poželjnija je kinetika prvog reda, osim ako je r2 < 0,7. Ako je prikladno, kalkulacije se takođe primenjuju na glavne proizvode transformacije. Primeri prikladnih modela dati su u literaturi**31-35**.

U slučaju ispitivanja brzina na različitim temperaturama, brzine transformacije opisane su Arenijusovom jednačinom, kao funkcija temperature unutar opsega ispitivane temperature:

k = A x e-B/T

ili

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| lnk = ln A - | B |  |
| T |  |

pri čemu:

ln A i B jesu konstante regresije iz prekida i nagiba, najbolje aproksimiranog pravca generisanog linearnom regresijom ln k prema 1/T;

*k* jeste konstanta brzine na temperaturi T;

T jeste temperatura u kelvinima (K).

Treba paziti na ograničeni opseg temperatura za koje će Arenijusova relacija biti važeća u slučaju da je transformacija dirigovana mikrobiološkom aktivnošću.

*2.2. PROCENA I TUMAČENJE REZULTATA*

Iako se ispitivanja izvode u veštačkim laboratorijskim uslovima, rezultati omogućavaju procenu brzine transformacije ispitivane supstance, kao i brzinu stvaranja i raspada proizvoda transformacije u terenskim uslovima**36,37**.

Studija puteva transformacije ispitivane supstance daje podatke o načinu na koji se primenjena supstanca strukturno menja u zemljištu hemijskim i mikrobiološkim reakcijama.

**3. IZVEŠTAJ**

IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- ime, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (naznačujući mesto obeležavanja, kad se koristi materijal označen radioizotopima) i odgovarajuća fizička i hemijska svojstva (videti odeljak 1.5. ove metode);

- čistoća (nečistoće) ispitivane supstance;

- radiohemijska čistoća obeležene hemikalije i specifična aktivnost (gde je prikladno);

2) referentnim supstancama:

- hemijski naziv i struktura referentnih supstanci koje se koriste za karakterizaciju, odnosno identifikaciju proizvoda transformacije;

3) ispitivanom zemljištu:

- detalji o mestu sakupljanja;

- datum i procedura uzimanja uzoraka zemljišta;

- svojstva zemljišta, kao što su pH vrednost, sadržaj organskog ugljenika, tekstura (% peska, % mulja, % gline), katjonski izmenjivački kapacitet, gustoća mase, svojstva zadržavanja vode i mikrobiološka biomasa;

- dužina skladištenja zemljišta i uslovi skladištenja (ako je skladišteno);

4) uslovima u toku ispitivanja:

- datumi ispitivanja;

- količina primenjene ispitivane supstance;

- upotrebljeni rastvarači i metoda njihove primene na ispitivanu supstancu;

- masa zemljišta tretiranog u početku i uzorkovanog u svakom intervalu za analizu;

- opis korišćenog sistema za inkubaciju;

- protoci vazduha (samo za protočne sisteme);

- temperature u ispitivanom sistemu;

- sadržaj vlage u zemljištu u toku inkubacije;

- mikrobiološka biomasa u početku, u toku i na kraju aerobnih studija;

- pH, koncentracija kiseonika i redoks potencijal u početku, u toku i na kraju anaerobnih i studija pirinčanih polja;

- metode ekstrakcije;

- metode za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivane supstance i glavnih proizvoda transformacije u zemljištu i apsorpcionim materijalima;

- broj replika i broj kontrola.

5) rezultatima:

- rezultat određivanja mikrobiološke aktivnosti;

- ponovljivost i osetljivost korišćenih analitičkih metoda;

- efikasnost primenjene analitičke tehnike (procenat vrednosti za prihvatljivu studiju su date u odeljku 1.7.1. ove metode);

- tabela rezultata izražena u procentima primenjene početne doze i gde je prikladno, u mg/kg tla (na bazi suve mase);

- maseni balans u toku i na kraju studije;

- karakterizacija radioaktivnosti koja se ne može ekstrahovati (vezana) ili rezidua u zemljištu;

- kvantifikacija ispuštenog CO2 i ostalih isparljivih materija;

- grafički prikaz koncentracija u zemljištu u funkciji vremena za ispitivanu supstancu i gde je prikladno, za glavne proizvode transformacije;

- poluživot ili DT50, DT75 i DT90 za ispitivanu supstancu i gde je prikladno, za glavne proizvode transformacije uključujući intervale poverenja;

- procena abiotičke degradacije u sterilnim uslovima;

- procena kinetike transformacije za ispitivanu supstancu i gde je prikladno, za glavne proizvode transformacije;

- predložen put transformacije, gde je prikladno;

- tumačenje rezultata;

- neobrađeni podaci (npr. primeri hromatograma, uzorci kalkulacija brzina transformacije i načina za identifikaciju proizvoda transformacije).

**4. LITERATURA**

1. US - Environmental Protection Agency, (1982) Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N.Chemistry: Environmental Fate.

2. Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticidesin Canada.

3. European Union (EU), (1995) Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending CouncilDirective 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II,Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

4. Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1995) Application for registration of a pesticide.Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5. BBA, (1986) Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib vonPflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6. ISO/DIS 11266-1, (1994) Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organicchemicals in soil - Part 1: Aerobic conditions.

7. ISO 14239, (1997) Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation oforganic chemicals in soil under aerobic conditions.

8. SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R.Lynch, Ed.

9. MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobicmetabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10. OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

11. Guth, J.A., (1980) The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J.Hance, Ed.), Academic Press, p. 123-157.

12. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley - VCH (1998).

13. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC1984).

14. OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

15. ISO 10381-6 (1993) Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling andstorage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16. Appendix V to Directive 67/548/EEC.

17. Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress inPesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

18. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc.Amer. Proc. 26:305 (1962).

19. Methods of Soil Analysis (1986) Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) AgronomySeries No 9, 2nd Edition.

20. Methods of Soil Analysis (1982) Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Millerand D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21. ISO Standard Compendium Environment (1994) Soil Quality - General aspects; chemical and physicalmethods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22. Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischenund petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23. Scheffer, F., Schachtschabel, P., (1975) Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24. Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., (1978) A physiological method for the quantitative measurement ofmicrobial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, p. 215-221.

25. ISO 14240-1 and 2 (1997) Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrateinducedrespiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26. Anderson, J.P.E., (1987) Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects onSoil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

27. Kato, Yasuhiro. (1998) Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformationof pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, p. 105-120.

28. Keuken O., Anderson J.P.E., (1996) Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides,Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

29. Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996) Effect offreeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology andSoil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

30. Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R., (1987) Effects of ethylene oxide on soil microbial content andsome chemical characteristics. Plant and Soil 102, p. 197-200.

31. Anderson, J.P.E. (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegungvon Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

32. Hamaker, J.W., (1976) The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.

33. Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W., (1975) Principles of pesticide degradation in soil. In 'Environmental Dynamics of Pesticides'. R. Haque and V.H. Freed, Eds., p. 135-172.

34. Timme, G., Frehse, H., Laska, V., (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.

35. Timme, G., Frehse, H., (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.

36. Gustafson D.I., Holden L.R., (1990) Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.

37. Hurle K., Walker A., (1980) Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.

**Deo drugi**

**NAPON VODE, POLJSKI KAPACITET ZEMLJIŠTA (FC) I KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE (WHC)XLI**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Visina vodenog stupa (cm) | pF**XLII** | bap**XLIII** | Napomene |
| 107 | 7 | 104 | Suvo zemljište |
| 1,6 x 104 | 4,2 | 16 | Tačka uvenuća |
| 104 | 4 | 10 |  |
| 103 | 3 | 1 |  |
| 6 x 102 | 2,8 | 0,6 |  |
| 3,3 x 102 | 2,5 | 0,33**XLIV** | |  |  | | --- | --- | | C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s147.gif | Opseg poljskog kapaciteta tlaXLV | | | | |
| 102 | 2 | 0,1 |
| 60 | 1,8 | 0,06 |
| 33 | 1,5 | 0,033 |
| 10 | 1 | 0,01 | WHC (približno) |
| 1 | 0 | 0,001 | Tlo zasićeno vodom |

Napon vode meri se u centimetrima vodenog stuba ili u barima. Zahvaljujući velikom opsegu sukcijske tenzije, izražava se kao pF vrednost koja je ekvivalent logaritmu cm vodenog stuba.

Poljski kapacitet se definiše kao količina vode koja se može zadržati u zemljištu suprotno sili teže dva dana nakon dužeg kišnog perioda, ili nakon dovoljno navodnjavanja. Određuje se u neporemećenom zemljištu na terenu *in situ*. Merenja nisu primenjiva na poremećene laboratorijske uzorke zemljišta. FC-vrednosti određene u poremećenim zemljištima mogu pokazati velike sistemske varijanse.

Kapacitet zadržavanja vode**XII** (water holding capacity, u daljem tekstu: WHC) određuje se u laboratoriji sa neporemećenim i poremećenim zemljištima zasićenjem zemljišnog stuba vodom, kapilarnim transportom. Posebno je korisno za poremećena zemljišta i može biti i do 30% veći od poljskog kapaciteta. Ispitivanjem je lakše odrediti WHC od pouzdane FC-vrednosti.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XLI** Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.  
**XLII** pF = log visine vodenog stuba  
**XLIII** 1 bar = 105 Pa  
**XLIV** Odgovara približnom sadržaju vode od 10% u pesku, 35% u ilovači i 45% u glini.  
**XLV** Poljski kapacitet nije konstantan nego varira sa tipom zemljišta između pF 1,5 i 2,5.

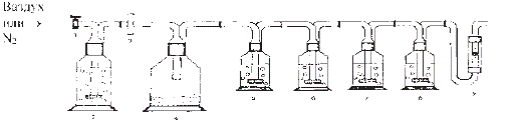
**Deo treći**

**SADRŽAJ VLAGE U TLU (G VODE NA 100 G SUVOG TLA) RAZLIČITIH TIPOVA ZEMLJIŠTA IZ RAZLIČITIH DRŽAVA**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| tip zemljišta | država | sadržaj vlage u tlu pri | | |
| WHC\* | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Pesak | Nemačka | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Pesak sa ilovačom | Nemačka | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Pesak sa ilovačom | Švajcarska | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Muljevita ilovača | Švajcarska | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Glinena ilovača | Brazil | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Glinena ilovača | Japan | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Peščana ilovača | Japan | 82,4 | 59.2 | 36,0 |
| Muljevita ilovača | SAD | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Peščana ilovača | SAD | 40,4 | 25,2 | 13,3 |
| \* Kapacitet zadržavanja vode (water holding capacity) | | | | |

**Deo četvrti**

Slika 1: Primer protočne aparature za ispitivanje transformacije hemikalija u zemljištu**XLVI, XLVII**



Pri čemu je:

1 - igličasti ventil;

2 - boca za ispiranje vazduhom koja sadrži vodu;

3 - ultramembrana (samo sterilni uslovi) veličina pora: 0,2 µm;

4 - boca za metabolizam zemljišta (uronjena u vodu samo za aerobne uslove i uslove pirinčanih polja);

5 - etilenglikol za hvatanje organskih isparljivih jedinjenja;

6 - sumporna kiselina za hvatanje alkalnih isparljivih jedinjenja;

7, 8 - natrijum hidroksid za hvatanje CO2 i drugih kiselih isparljivih materija;

9 - merač protoka.

Slika 2: Primer boca tipa biometra za ispitivanje transformacije hemikalija u zemljištu**XLVIII**

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Program Files (x86)\ParagrafLex\browser\Files\Old\t\t2013_12\t12_0570_s149.gif | Na - kreč za apsorbovanje CO2  Staklena vuna tretirana uljem ili poliuretenskom penom za apsorbovanje organskih isparljivih jedinjenja  Zemljište + ispitivana supstanca |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XLVI** Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.  
**XLVII** Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.  
**XLVIII** Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p.141-146.

**C.24. AEROBNE I ANAEROBNE TRANSFORMACIJE U SISTEMIMA VODA - SEDIMENT**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Metoda se zasniva na Uputstvu za ispitivanje OECD 308 (2002).

*1.1. UVOD*

Hemikalije dospevaju u plitke ili duboke površinske vode usled neposredne primene, putem raspršivanja, spiranja, drenaže, odlaganja otpada, otpadnih voda iz industrije, domaćinstava ili poljoprivrede i atmosferskog taloženja. Ova metoda ispitivanja opisuje laboratorijski postupak za procenu aerobne i anaerobne konverzije organskih hemikalija u sistemima voda-sediment. Metoda se zasniva na uputstvima koja su navedena u literaturi**1,2,3,4,5,6**. Broj i tip sedimenata koji se koriste u ovom ispitivanju utvrđen je na OECD radionici o izboru zemljišta/sedimenta**7**. Tom prilikom date su preporuke za sakupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka sedimenata zasnovane na ISO standardu**8**. Ispitivanje je neophodno za hemikalije koje se neposredno dodaju u vodu ili dospevaju u vodu ostalim navedenim putevima.

Uslovi u prirodnim sistemima voda-sediment su često aerobni u gornjoj vodenoj fazi. Površinski sloj sedimenta je ili aeroban ili anaeroban, dok je dublji sediment najčešće anaeroban. Da bi se obuhvatile sve ove mogućnosti, pojedinačno su opisana i aerobna i anaerobna ispitivanja. Aerobno ispitivanje simulira aerobni vodeni stub iznad aerobnog sloja sedimenta koji je naglašen anaerobnim gradijentom. Anaerobno ispitivanje simulira potpuno anaerobni sistem voda-sediment. U slučaju značajnog odstupanja od navedenih postavki, npr. kada se koriste intaktna sedimentna jezgra ili sedimenti koji su već bili izloženi ispitivanim supstancama, na raspolaganju su druge metode ispitivanja**9**.

*1.2. DEFINICIJE*

Koriste se standardne međunarodne merne jedinice (SI).

Ispitivana supstanca jeste bilo koja supstanca, bilo da je u pitanju polazna supstanca ili odgovarajući proizvodi konverzije.

Proizvodi transformacije jesu sve supstance koje proističu iz biotičkih i abiotičkih reakcija transformacije ispitivane supstance uključujući i CO2 i vezane ostatke.

Vezani ostaci jesu jedinjenja u zemljištu, biljkama ili životinjama koja opstaju u matriksu bilo u obliku polazne supstance, ili njenih metabolita nakon procesa ekstrakcije. Metoda ekstrakcije ne sme ne sme da dovede do značajne izmene samih jedinjenja ili strukture matriksa. Priroda veze može se delom objasniti metodama ekstrakcije koje menjaju matriks i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Do danas su, npr. na ovaj način otkrivene kovalente jonske i sorptivne veze, kao i molekulske klopke. U principu, obrazovanje vezanih ostataka značajno smanjuje biodostupnost i bioraspoloživost**10** (modifikovani IUPAC 1984**11izveštaj**).

Aerobna konverzija jesu oksidujuće reakcije koje se odvijaju u prisustvu molekularnog kiseonika**12**.

Anaerobna konverzija jesu redukujuće reakcije koje se odvijaju u odsustvu molekularnog kiseonika**12**.

Prirodne vode jesu površinske vode iz jezera, reka ili potoka itd.

Sediment jeste mešavina neorganskih i organskih hemijskih sastojka. Organski sastojci sadrže jedinjenja sa visokim sadržajem ugljenika i azota i visoke molekulske mase. Taloži se putem prirodne vode i integriše se sa tom vodom.

Mineralizacija jeste potpuna razgradnja nekog organskog jedinjenja do CO2, H 2O u aerobnim uslovima, ili do CH4, CO2 i H2O u anaerobnim uslovima. U ovoj metodi ispitivanja, kada se koristi jedinjenje obeleženo radioizotopom, mineralizacija označava sveobuhvatnu razgradnju molekula u toku koje se obeleženi atom ugljenika oksiduje ili se redukuje srazmerno oslobođenoj količini C14O2 ili C14H4.

Vreme poluraspada (t0,5) jeste vreme potrebno za konverziju 50% ispitivane supstance, u slučaju kada se konverzija može objasniti kinetikom prvog reda, nezavisno od početne koncentracije.

Vreme poluraspada 50 (u daljem tekstu: DT50) jeste vreme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 50%.

Vreme poluraspada 75 (u daljem tekstu: DT75)jeste vreme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 75%.

Vreme poluraspada 90 (u daljem tekstu: DT90)jeste vreme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 90%.

*1.3. REFERENTNE SUPSTANCE*

Referentne supstance se koriste za indentifikaciju i kvantifikaciju proizvoda konverzije uz pomoć spektroskopskih i hromatografsih metoda.

*1.4. PODACI O ISPITIVANIM SUPSTANCAMA*

Neobeležene ispitivane supstance kao i ispitivane supstance obeležene izotopima mogu se koristiti u merenju stope transformacije iako se za ovo preporučuje obeleženi materijal. Obeleženi materijal je potreban za proučavanje puteva transformacije i za utvrđivanje masenog bilansa. C14 označavanje se preporučuje ali i upotreba ostalih izotopa kao što su C13, N15, H3, P32, može biti korisna. Kadagod je moguće, izotopska oznaka treba da bude ugrađena u najstabilniji deo molekula**XLIX**. Hemijska, odnosno radiohemijska čistoća ispitivane supstance je najmanje 95%. Pre početka ispitivanja neophodne su sledeće informacije o supstanci koja se ispituje:

- rastvorljivost u vodi (videti metodu A.6. u Prilogu 1 ovog pravilnika);

- rastvorljivost u organskim rastvaračima;

- pritisak pri isparavanju (videti metodu A.4. u Prilogu 1 ovog pravilnika) i Henrijeva konstanta;

- koeficijent raspodele u sistemun-oktanol/voda (videti metodu A.8. u Prilogu 1 ovog pravilnika);

- koeficijent adsorpcije - Kd, Kf ili Koc, kada je moguće (videti metodu C.18. ovog priloga);

- hidroliza (videti metodu C.7. ovog priloga);

- konstanta disocijacije - pKa (smernice OEBS 112)**13**;

- hemijska struktura ispitivane supstance i mesto vezivanja izotopa, ukoliko je moguće.

Napomena: zabeležiti temperaturu na kojoj su rađena merenja.

Korisno je imati i podatke o toksičnosti ispitivane supstance pomikroorganizme, podatke o brzoj, odnosno inherentnoj biorazgradljivosti i podatke o aerobnoj i anaerobnoj konverziji u zemljištu.

Potrebno je da budu dostupne analitičke metode (uključujući i metode ekstrakcije i ispiranja) za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivane supstance i proizvoda njene konverzije u vodi i sedimentu (videti odeljak 1.7.2. ove metode).

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**XLIX** Na primer, ukoliko supstanca sadrži samo jedan prsten, on se obavezno obeležava. Ukoliko ispitivana supstanca sadrži dva ili više prstenova, mogubiti neophodna pojedinačna istraživanja da bi se procenila sudbina svakog obeleženog prstena i dobili odgovarajući podaci o formiranju proizvoda konverzije.

*1.5. PRINCIP METODE ISPITIVANJA*

U ispitivanju se koristi aerobni i anaerobni sistem voda-sediment (videti Deo drugi ove metode) koji omogućava:

- merenje stope konverzije ispitivane supstance u sistemu voda-sediment;

- merenje stope konverzije ispitivane supstance u sedimentu;

- merenje stope mineralizacije ispitivane supstance, odnosno produkata konverzije (kada se koristi ispitivana supstanca obeležena radioizotopom C14);

- identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda konverzije u vodi i sedimentu uključujući i maseni bilans (kada se koristi obeležena ispitivana supstanca);

- merenje distribucije ispitivane supstance i njenih proizvoda konverzije između dve faze u periodu inkubacije u zamračenim uslovima na konstantnoj temperaturi (da bi se izbeglo, npr. cvetanje algi). DT50, DT75 i DT90 vrednosti se određuju u kratkom roku nakon ispitivanja i ne mogu biti izvedene mnogo posle perioda ispitivanja (videti odeljak 1.2. ove metode).

Potrebna su najmanje dva tipa sedimenta i odgovarajućih uzoraka vodenog stuba kako za aerobno tako i za anaerobno ispitivanje**7**. Postoje slučajevi kada bi trebalo koristiti više od dva tipa sedimenta, npr. za hemikalije koje se mogu naći u slatkovodnom, odnosno morskom okruženju.

*1.6. PRIMENA METODE*

Metoda se u većini slučajeva primenjuje za ispitivanje supstanci (obeleženih ili neobeleženih) za koje postoji dovoljno precizan i osetljiv analitički postupak. Primenjuje se na jedinjenja koja su minimalno isparljiva, neisparljiva, rastvorljiva i nerastvorna u vodi. Ova ispitivanja ne primenjivati na hemikalije koje su visoko isparljive iz vodenog rastvora (npr. fumiganti, organski rastvarači) i zbog toga se u ne mogu zadržati u vodi, odnosno sedimentu pod ispitivanim uslovima.

Do sada se ovaj metod primenjivao da bi se izučile konverzije hemikalija u slatkoj vodi i sedimentima, ali može primeniti i na estuarske/morske ekosisteme. Nije preporučljivo da se simuliraju uslovi u tekućim vodama (npr. reke) ili otvorenom moru.

*1.7. KRITERIJUM KVALITETA*

**1.7.1. Efikasnost primenjene analitičke tehnike**

Ekstrakcija i analiza, najmanje u duplikatu, svih uzoraka vode i sedimenta, odmah nakon dodavanja ispitivane supstance, daje prve indikacije o efikasnosti analitičke metode i identičnosti postupaka koji se primenjuju na supstance. Efikasnost u kasnijim fazama ispitivanja su data u odgovarajućem balansu mase (onda kada se koristi obeleženi materijal). Efikasnost je u opsegu od 90% do 110% za obeležene hemikalije**6** i od 70% do 110% za neobeležene hemikalije.

**1.7.2. Ponovljivost i osetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode (isključujući inicijalnu efikasnost ekstrakcije) radi kvantifikacije ispitivane supstance i proizvoda transformacije se može proveravati ponovljenom analizom (dva ponavljanja) istog ekstrakta vode ili uzorka sedimenta koji su bili inkubirani dovoljno dugo da bi se formirali proizvodi transformacije.

Granica detekcije (LOD) analitičke metode za ispitivane supstance i proizvode konverzije je najmanje 0,01 mg/kg u vodi ili sedimentu (kao ispitivana supstanca) ili 1% početne količine koja je primenjena na ispitivanjalni sistem. Kao granica detekcije primenjuje se uvek niža vrednost. Takođe navesti granicu kvantifikacije (LOQ).

**1.7.3. Preciznost podataka konverzije**

Regresiona analiza koncentracije ispitivane supstance u funkciji vremena daje odgovarajuće informacije o preciznosti krive konverzije i omogućava izračunavanje intervala poverenja za vrednosti poluraspada (ako se može primeniti pseudo kinetika prvog reda) ili vrednosti DT50 i ako više odgovara, vrednosti DT75 i DT90.

*1.8. OPIS METODE*

**1.8.1. Ispitivanjalni sistem i aparatura**

Istraživanje se sprovodi u staklenim posudama (npr. flaše, kivete), osem ukoliko prethodne informacije (poput koeficijenta raspodele u sistemu n-oktanol/voda, podaci o sorpciji, itd.) pokažu da ispitivana supstanca prijanja uz staklo, u tom slučaju se koristi altrenativni materijal (kao što je teflon). Ako je poznato da ispitivana supstanca prijanja uz staklo moguće je prevazići ovaj problem korišćenjem jednog ili više navedenih postupaka:

- odrediti masu ispitivane supstance i proizvoda konverzije koji prijanjaju uz staklo;

- na kraju ispitivanja obezbediti ispiranje sudova rastvaračem;

- korišćenje formulisanih proizvoda (videti odeljak 1.9.2. ove metode);

- uvećavanjem količine ko-rastvarača radi dodavanja ispitivane supstance u sistem; ukoliko se koristi ko-rastvarač onda je on takav da ne rastvori ispitivanu supstancu.

Primeri tipične ispitivane aparature odnosno gas-protočnog i biometarskog sistema, su dati u Delu trećem i četvrtom**14**. Ostali korisni inkubacioni sistemi su opisani u literaturi**15**. Dizajn aparature koja se koristi pri eksperimentu bi trebalo da omogući razmenu vazduha ili azota i hvatanje isparljivih proizvoda. Dimenzije aparature su takve da ispunjavaju uslove koji se zahtevaju u ispitivanju (videti odeljak 1.9.1. ove metode). Ventilacija se može obezbediti bilo laganim mešanjem ili propuštanjem vazduha ili azota po vodenoj površini. U drugom slučaju preporučljivo je lagano mešanje vode odozgo radi bolje distribucije kiseonika ili azota u vodi. Vazduh koji ne sadrži CO2 se ne koristi jer bi to dovelo do povećanja pH vode. U svakom slučaju poremećaji sedmenta su nepoželjni i izbegavaju se koliko god je to moguće. Blago isparljive hemikalije da se ispituju u sistemu biometarskog tipa pri laganom mešanju vodene površine. Koriste se i zatvorene posude sa slobodnim prostorom na vrhu, bilo za atmosferski vazduh ili azot i unutrašnjim sistemom koji služi za zadržavanje isparljivih proizvoda konverzije**16**. Kod ispitivanja aerobnih konverzija neophodna je redovna razmena gasa na vrhu epruvete da bi se kompenzovala potrošnja kiseonika od strane biomase.

Za sakupljanje isparljivih proizvoda konverzije koristi se 1 mol/dm3 rastvora natrijum-hidroksida ili kalijum-hydroksida za ugljen dioksid**L** i etilen glukol, etanolamin ili 2% parafinske kiseline za organska jedinjenja. Isparljiva jedinjenja koja nastaju u anaerobnim uslovima, kao što je metan, mogu se sakupiti npr. pomoću molekulskih sita. Takva isparenja se npr. sagorevaju do CO2 prilikom propuštanja gasa kroz kvarcnu cev napunjenu sa CuO na temperaturi od 900 °C i hvatanjem nastalog CO2 u absorber sa bazama**17**.

Potrebni su laboratorijski merni instrumenti za hemijsku analizu ispitivane supstance i proizvoda konverzije (npr. hromatografija tečnog gasa - GLC, tečna hromatografija visokih performansi - HPLC, hromatografija tankog sloja - TLC, spektroskopija mase - MS), hromatografija gasa - spektroskopija mase - GC-MS, tečna hromatografija - spektroskopija mase - LC-MS, nuklearna magnetska rezonanca - NMR, itd), uključujući i sisteme za otkrivanje hemikalija koje su obeležene ili neobeležene radioizotopima, kada je to moguće. Kada se koristi materijal radio izotopski obeležen takođe je potreban i tečni scintilacioni brojač i oksidant sagorevanja (za sagorevanje uzoraka sedimenta pre radioaktivne analize).

Po potrebi, može biti neophodna i ostala standardna laboratorijska oprema za fizičko hemijska i biološka određivanja (videti Tabelu 1. u odeljku 1.8.2.2. ove metode), laboratorijsko staklo, hemikalije i reagensi.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**L** Kako ovi alkalni apsorpcioni rastvori apsorbuju i ugljen dioksid iz ventilacionog vazduha i ugljen dioksid koji nastaje u precesudisanjapri aerobnom ispitivanju, oni se zamenjuju u redovnim intervalima da bi se izbeglo njihovozasićenje, a time i gubitak apsorbcionog kapaciteta.

**1.8.2. Izbor i broj uzoraka vodenih sedimenata**

Mesto za uzimanje uzorka sedimenta se određuje za svaku posebnu situaciju u skladu sa svrhom ispitivanja. Prilikom izbora mesta za uzimanje uzorka, uzeti u obzir prethodni uticaj poljoprivrede, industrije i domaćinstava na slivno područje, kao i na sektor neposredno uzvodno od lokaliteta. Sedimenti se ne smeju koristiti ukoliko su zagađeni ispitivanom supstancom ili njenim strukturnim analozima u prethodne četiri godine.

*1.8.2.1. Izbor sedimenta*

Dva tipa sedimenta se obično koriste pri aerobnim studijama**7**. Dva izabrana uzorka sedimenta se razlikuju po sadržaju organskog ugljenika i granulometrijskom sastavu. Jedan sediment ima visok sadržaj organskog ugljenika (2,5-7,5%) i dominantno ga čine fine frakcije, a drugi sediment ima niži sadržaj organskog ugljenika (0,5-2,5%) i dominiraju krupne frakcije. Razlika u sadržaju organskog ugljenika je najmanje 2%. Muljevito - glinoviti**LI** sediment sadrži > 50% fine frakcije, za razliku odglinovito - muljevitog sedimenta kod koga je taj sadržaj < 50%. Razlika između sadržaja mulja i gline dva sedimenta je najmanje 20%. U slučajevima kada hemikalija dospe u morske vode, najmanje jedan od sistema sediment - voda je morskog porekla.

Za striktno anaerobna istraživanja, dva uzorka sedmimenta (uključujući i pripadajuće vode) uzeti iz anaerobnih zona površinske vode**7**. I uzorci vode i uzorci sedimenta se pažljivo transportuju bez prisustva kiseonika.

Ostali parametri koji mogu biti od važnosti prilikom izbora sedimenta posmatraće se od slučaja do slučaja. Npr. pH vrednost sedimenta je važan parametar za ispitivanje hemikalija čija razgradljivost, odnosno sorpcija zavisi od pH vrednosti. pH zavisnost može da se ogleda preko pKa ispitivane supstance.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**LI** Glina - mulj je mineralna frakcija sedimenta veličine< 50 μm.

*1.8.2.2. Karakterizacija uzoraka sistema voda-sediment*

Ključni parametri koji se mere i beleže (uz navođenje upotrebljene metode) kako u vodi tako i u sedimentu, kao i vremenska dinamika merenja, navedeni su u tabeli ispod. Informativno, metode za određivanje ovih parametara date su u literaturi**17,18,19,20**. Zavisno od slučaja ukazuje se potreba za merenjem i prikazivanjem vrednosti i drugih parametara (npr. za svežu vodu - čestice, alkalitet, tvrdoća, provodljivost, NO3/PO4 odnos i pojedinačne vrednosti; za sedimente - jonska izmena, vodni kapacitet, karbonati, ukupni azot i fosfor; za morske sisteme - salinitet). Analiza sedimenata i vode na nitrate, sulfate, biodostupno gvožđe i moguće druge elektron akceptore može biti od koristi u proceni redukcionih procesa, naročito kod anaerobne transformacije.

Merenje parametara za karakterizaciju uzoraka sistema sediment - voda**7,21,22**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Faza postupka | | | | | |
| uzimanje uzoraka na terenu | naknadno rukovanje uzorkom | početak aklimatizacije | početak ispitivanja | u toku ispitivanja | kraj ispitivanja |
| Voda |  |  |  |  |  |  |
| Poreklo/ izvor | x |  |  |  |  |  |
| Temperatura | x |  |  |  |  |  |
| pH | x |  | x | x | x | x |
| TOC |  |  | x | x |  | x |
| Konc. O2**LII** | x |  | x | x | x | x |
| Oksido-redukcioni potencijal**XLVII** |  |  | x | x | x | x |
| Sediment |  |  |  |  |  |  |
| Poreklo/ izvor | x |  |  |  |  |  |
| Dubina sloja | x |  |  |  |  |  |
| pH |  | x | x | x | x | x |
| Granulo-metrijski sastav |  | x |  |  |  |  |
| TOC |  | x | x | x |  | x |
| Biomasa mikroorga-nizama |  | x |  | x |  | x |
| Oksido-redukcioni potencijal**LIII** | Opažanje (boja/miris) |  | x | x | x | x |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**LII** Metoda stope mikrobne respiracije**26**, metod fumigacije**27** ili brojanje na Petrijevim šoljama (npr. broj bakterija, aktinomiceta, gljiva i ukupan broj kolonija) za aerobne studije, a stopa metanogeneze za anaerobne studije.  
**LIII** Rezultati novijih istraživanja su pokazali da merenja koncentracije kiseonika u vodi i oksidaciono redukcionog potencijala nemaju ni mehanističku niti vrednost u cilju predviđanja rasta i razvoja populacije mikroorganizama u površinskim slojevima voda**24,25**. Određivanje biohemijske potrošnje kiseonika (BPK), prilikom uzimanja uzoraka na terenu, na početku i na kraju ispitivanja) i koncentracija mikro/makro nutrijenata Ca, Mg i Mn (na početku i kraju ispitivanja) u vodi kao i ukupni N i ukupni P u sedimentu (prilikom uzimanja uzoraka na terenu i na kraju ispitivanja) predstavljaju bolje parametre za tumačenje i procenu i stope i puteva biotransformacije.

**1.8.3. Sakupljanje, rukovanje i skladištenje**

*1.8.3.1. Sakupljanje*

Za uzorkovanje sedimenta dna koristi se ISO standard**8** Uzorci se uzimaju iz gornjeg sloja sedimenta dubine 5 cm do 10 cm. Voda koja se koristi uzima se sa istog mesta ili lokacije i u isto vreme kada i sediment. Za anaerobnu studiju, uzorci sedimenta i vode koji se koriste uzeti su bez kiseonika**27** (videti odeljak 1.8.2.1. ove metode). Neki od uređaja za uzimanje uzoraka opisani su u literaturi**8,22**.

*1.8.3.2. Rukovanje*

Sediment se odvaja filtracijom kroz sito promera 2 mm pomoću viška vode koja se potom odbacuje. Poznata količina sedimenta i vode meša se u potrebnom odnosu (videti odeljak 1.9.1. ove metode) u inkubacionim bocama i priprema za period inkubacije (videti odeljak 1.8.4. ove metode). Za anaerbonu studiju svi koraci u postupku se sprovode bez prisustva kiseonika**28,1,30,31,32**.

*1.8.3.3. Skladištenje*

Preporučuje se korišćenje svežeg sedimenta i vode, ali ukoliko je potrebno skladištenje, sediment i voda se prosejavaju na gore opisan načini i skladište se zajedno, vodeni stub (6 cm do 10 cm vodenog sloja), u mračnoj prostoriji, najduže dve nedelje**7,8,22** na temperaturi od (4 ± 2)° C. Uzorci koji se koriste u aerobnim studijama se skladište tako da imaju dotok vazduha (npr. otvoreni kontejneri), dok se oni koji se koriste za anaerobne studije skladište bez kiseonika. Zamrzavanje sedimenta i vode ili isušivanje sedimenta se ne sme dogoditi u toku transporta i skladištenja.

**1.8.4. Priprema uzoraka sedimenta/vode za ispitivanje**

Period aklimatizacije je pre dodavanja ispitivane supstance i svaki od uzoraka sediment/voda koji se koristi u glavnom ispitivanju stavlja se u inkubacioni sud. Aklimatizacija je pod istim uslovima kao i inkubacija (videti odeljak 1.9.1. ove metode). Pod periodom aklimatizacije se podrazumeva vremenski period potreban za postizanje određene stabilnosti, na šta ukazuju pH vrednost, koncentracija kiseonika u vodi, oksido-redukcioni potencijal sedimenta u vodi i makroskopska podela faza. Period aklimatizacije uobičajeno traje jednu do dve nedelje, a ne bi trebalo da traje duže od četiri nedelje. Rezultate ispitivanja koja su urađena u ovom periodu zabeležiti.

*1.9. IZVOĐENJE ISPITIVANJA*

**1.9.1. Uslovi pod kojima se obavlja ispitivanje**

Ispitivanje se izvodi u inkubcionoj aparaturi (videti odeljak 1.8.1. ove metode) u zapreminskom odnosu voda: sediment između 3:1 i 4:1 i sloja sedimenta dubine 2,5 cm (± 0,5 cm)**LIV**. Minimalna preporučena količina sedimenta je 50 g suve mase po inkubacionom sudu.

Ispitivanje se izvodi u mračnoj prostoriji na ujednačenoj temperaturi od 10° C do 30° C. Odgovarajuća temperatura je 20° C ± 2° C. Ukoliko je moguće, zavisno od slučaja do slučaja, može se uzeti u obzir dodatna niža temperatura (npr. 10° C), zavisno od informacije koja se dobija iz ispitivanja. Inkubaciona temperatura se kontroliše i beleži.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**LIV** Preporučuje se količina od najmanje 50 g sedimenta (suve mase) po inkubacionoj posudi.

**1.9.2. Priprema i uvođenje ispitivane supstance**

Koristi se uvek jedna doza ispitivane hemikalije**LV**. U slučajevima u kojima su sredstva za zaštitu bilja direktno uneta u vodu, smatra se da je maksimalno dozvoljena količina navedena na etiketi datog sredstva maksimalna koncentracija na površini suda u kome se obavlja eksperiment. Koristi se maksimalna doza koja je data na etiketi. U svim ostalim slučajevima, koncentracija koja se koristi bazira se na proračunima iz emisija u životnu sredinu. Vodi se računa da se obezbedi primena odgovarajuće količine ispitivane supstance kako bi se izvršila karakterizacija puteva konverzije, kao i obrazovanje i razgradnja proizvoda konverzije. Možda je potrebno upotrebiti veće doze (npr. 10 puta) u situacijama kada su koncentracije ispitivane supstance blizu granice detekcije na početku studije, odnosno kada se glavni produkti konverzije ne mogu odmah opaziti kada su prisutni u udelu od najmanje 10% u odnosu na ispitivanu supstancu. Međutim, ukoliko se koriste veće ispitivane koncentracije one ne bi trebalo da imaju značajnije štetno dejstvo na aktivnosti mikroorganizama sistema voda-sediment. Da bi se postigla stalna koncentracija ispitivane supstance u posudama različitih dimenzija, može se uzeti u obzir prilagođavanje količine materijala koji se koristi, na osnovu dubine vodenog stuba u posudi u odnosu na dubinu vode na terenu (pretpostavlja se da je 100 cm, ali i ostale dubine se mogu uzeti u obzir). Primer kalkulacije videti u Delu petom ove metode.

U idealnim okolnostima ispitivana supstanca se primenjuje kao vodeni rastvor u vodenoj fazi sistema za ispitivanje. Ukoliko se ne može izbeći, dozvoljeno je korišćenje male količine rastvarača koji se mešaju sa vodom (kao što je aceton, etanol) radi upotrebe i distribucije ispitivane supstance, ali ona ne sme da bude veća od 1% v/v i ne sme da ima štetno dejstvo na mikrobnu aktivnost sistema za ispitivanje. Treba obratiti pažnju na sakupljanje vodenog rastvora ispitivane supstance - korišćenje generatora kolone i prethodno mešanje se može koristiti da bi se obezbedila totalna homogenost. Nakon dodavanja vodenog rastvora u ispitivanjalni sistem, preporučuje se lagano mešanje vodene faze, vodeći računa da se što manje narušava sediment.

Ne preporučuje se rutinsko korišćenje formulisanih produkata pošto sastojci formulacije mogu da utiču na raspored ispitivane supstance, odnosno proizvoda konverzije između vodene i sedimentne faza. Međutim, korišćenje formulisanih materijala može biti odgovarajuća alternative za supstance koje se slabo rastvaraju u vodi.

Broj inkubacionih posuda zavisi od različite dužine vremena prilikom uzimanja uzoraka (videti odeljak 1.9.3. ove metode). Trebalo bi uključiti dovoljno veliki broj ispitivanih sistema da bi se dva eksperimentalna sistema mogla žrtvovati pri svakom uzorkovanju. Kada se koriste kontrolne jedinice svakog sistema voda-sediment, ne bi trebalo da se drže zajedno sa ispitivanom supstancom.

Kontrolne jedinice se mogu koristiti za određivanje biomase mikroorganizama sedimenta i ukupnog organskog ugljenika vode i sedimenta prilikom završetka studije. Dve kontrolne jedinice (odnosno jedna kontrolna jedinica za svaki sistem voda sediment) se može koristiti da bi se pratili traženi parametri u sedimentu i vodi u toku perioda aklimatizacije (videti tabelu u odeljku 1.8.2.2. ove metode). Dve dodatne kontrolne jedinice uključiti u slučaju da se ispitivana supstanca primenjuje putem rastvarača da bi se izmerila štetna dejstva na aktivnosti mikroorganizama u ispitivanjalnom sistemu.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**LV** Ispitivanje sa drugom koncentracijom može biti od koristi za hemikalije koje dospevaju u površinske vode različitim putevima unosa i kao rezultat imaju dramatično različitu koncentraciju, sve dok se niža koncentracija može analizirati sa dovoljnom preciznošću.

**1.9.3. Trajanje ispitivanja i uzimanje uzoraka**

Eksperiment ne bi trebalo da traje duže od 100 dana**6**, i nastavlja se sve dok se ne uspostave putevi konverzije i distribucije vode/sedimetna ili kada kada dođe do raspada ispitivane supstance od 90% bilo razgradnjom, odnosno isparavanjem. Broj uzoraka u toku trajanja ispitivanja bi trebalo da bude najmanje šest (uključujući i nulto vreme), uz korišćenje opcione preliminarne studije (videti odeljak 1.9.4. ove metode) da bi se ustanovio pravilan režim uzimanja uzoraka i dužina trajanja ispitivanja, osem ukoliko ne postoje dovoljne informacije o ispitivanoj supstanci iz prethodnih studija. Za hidrofobne supstance, u toku inicijalnog perioda studije je možda potrebno uzeti dodatne uzorke, da bi se odredila stopa distribucije između vode i sedimentih faza.

Pri odgovarajućem vremenu uzorkovanja, celi inkubacioni sudovi (u kopiji) se sklanjaju radi analize. Sediment koji se nalazi u vodi analizira se posebno**LVI**. Površinske vode se pažljivo uklanjaju uz minimalno uznemiravanje sedimenta. Ekstrakcija i karakterizacija ispitivane supstance i proizvoda konverzije prati odgovarajuće analitičke procedure. Treba voditi računa da se ukloni materijal koji se absorbovao u inkubacionom sudu ili u povezanim epruvetama koje se koriste za sakupljanje isparenja.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
**LVI** U slučajevima kada može da dođe do rapidne re-oksidacije anaerobnih proizvoda razgradnje, anerobni uslovi se održavaju tokom analize i uzimanja uzoraka

**1.9.4. Opciona preliminarna studija**

Ukoliko se režim uzimanja uzoraka i njegova dužina ne mogu odrediti iz ostalih relevantnih studija na ispitivanoj supstanci, može se uzeti u razmatranje opciono preliminarno ispitivanje, koja se izvodi u istim uslovima koji su predloženi za krajnju studiju. U slučaju da se preliminarno ispitivanje izvodi, ukratko navesti merodavne uslove ispitivanja i dobijene rezultate.

**1.9.5. Merenja i analize**

Koncentracija ispitivane supstance i proizvoda konverzije pri svakom uzorkovanju u vodi i sedimentu meri se i zapisuje (ili kao koncentracija ili kao procenat od nanete supstance). U bilo kom vremenu uzimanja uzoraka identifikuju se proizvodi konverzije uočeni na ≥ 10% primenjene radioaktivnosti u ukupnom sistemu voda-sediment, osim ukoliko ne postoje opravdani razlozi da se drugačije postupi. Prilikom identifikacije uzimaju se u obzir i proizvodi konverzije čije se koncentracije konstantno povećavaju tokom ispitivanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze utvrđene nivoe, jer ovo ukazuje na njihovu perzistenciju. Perzistentnost supstance se razmatra od slučaja do slučaja i obrazlaže u izveštaju.

Rezultati dobijeni iz sistema za hvatanje gasova/isparenja (CO2 i ostali, odnosno isparljiva organska jedinjenja) beleže se pri svakom uzorkovanju. Stope mineralizacije se beleže. Neizdvojivi (vezani) ostaci u sedimentu se beleže prilikom svakog uzimanja uzoraka.

**2. PODACI**

*2.1. POSTUPANJE SA REZULTATIMA*

Ukupan maseni balans ili efikasnost (videti odeljak 1.7.1. ove metode) dodate radioaktivnosti se izračunava pri svakom uzimanju uzoraka. Rezultati se beleže kao procenat dodate radioaktivnosti. Distribucija radioaktivnosti između vode i sedimenta se beleže ili kao koncentracija ili kao procenat, pri svakom uzimanju uzoraka.

DT50 i ukoliko je moguće, DT75 i DT90 ispitivane supstance se izračunava zajedno sa odgovarajućim intervalima poverenja (videti odeljak 1.7.3. ove metode). Podaci o stopi rasipanja ispitivane supstance u vodi i sedimentu se mogu dobiti korišćenjem odgovarajuće pseudo kinetike prvog reda, odnosno tehnike empirijskog određivanja krive koja primenjuje grafička ili numerička rešenja ili još kompleksnijih procena u vidu pojedinačnih ili multi-dimenzionalnih modela. Detaljnije videti u literaturi**34,35,36**.

Svi ovi pristupi imaju svoje dobre i loše strane i značajno variraju u svojoj kompleksnosti. Pretpostavljena kinetika prvog reda može biti preterano pojednostavljenje konverzije i procesa raspodele, ali kada je god je to moguće daje vremensku odrednicu (stopu konstante ili poluživot), koja se jednostavno razume i od velikog je značaja u modelima simulacije i kalkulacijama procesa konverzije i raspodele predviđenih koncentracija u životnoj sredini. Empirijski pristupi ili linearna transformacija mogu dovesti do boljeg prilagođavanja krive podacima i doprineti boljoj proceni poluživota, DT50 i kad god je moguće, vrednosti DT75 i DT90. Korišćenje izvedenih konstanti je ograničeno. Modeli odvojenih posuda mogu generisati znatan broj korisnih vrednosnih konstanti u proceni rizika koje opisuje stopu konverzije u različitim posudama i raspodele hemikalije. Izbor metode u svakom slučaju se opravdava a eksperimentator grafički ili statistički dokumentuje da je izbor metoda odgovarajući.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturnu formulu (naznačiti poziciju izotop kada se koristi radio obeleženi materijal) i relevantna fizička i hemijska svojstva;

- čistoća (nečistoća) ispitivane supstance;

- radiohemijska čistoća obeležene hemikalije i aktivnosti molekula (kada je to moguće);

2) referentnim supstancama:

- hemijski naziv i struktura referentne supstance koja se koristi za karakterizaciju, odnosno identifikaciju proizvoda konverzije;

- Sediment i voda korišćeni u ispitivanju:

- lokacija i opis mesta na kome su uzeti uzorci sedimenta, uključujući, ukoliko ih imamo, podatke o prethodnom zagađenju;

- sve informacije vezane za sakupljanje, skladištenje (ukoliko postoje) i aklimatizaciju sistema voda-sediment;

- svojstva sistema voda-sediment na način prikazan u tabeli u odeljku 1.8.2.2;

3) uslovima pod kojima se obavlja ispitivanje:

- ispitivanjalni sistem koji se koristi (npr. protočni sistem, biometar, način ventilacije, metod mešanja, zapremina vode, masa sedimenta, visina vode i sedimentnog sloja, dimenzije posuda u kojima se obavlja ispitivanje, itd.

- uvođenje ispitivane supstance u ispitivanjalni sistem: korišćena koncentracija, broj duplikata i kontrola, način primene ispitivane supstance (npr. korišćenje rastvarača ukoliko ih ima), itd;

- temperatura inkubacije;

- vreme uzimanja uzoraka;

- ekstrakcione metode i efikasnost kao i analitičke metode i granice detekcije;

- metode za karakterizaciju/identifikaciju proizvoda konverzije;

- odstupanja od protokola metode ispitivanja ili uslova u kojim se odvija ispitivanje u toku studije;

4) rezultatima:

- neobrađeni podaci reprezentativnih analiza (svi neobrađeni podaci se arhiviraju u skladu sa principima dobre laboratorijske prakse - GLP);

- ponovljivost i osetljivost korišćenog analitičkog metoda;

- efikasnost analitičke tehnike (% vrednosti validne studije su dati u odeljku 1.7.1);

- tabele sa rezultatima izražene u % primenjene doze i u mg/kg vode, sedimenta i ukupnog sistema (samo u %) za ispitivanu supstancu i ukoliko je moguće za proizvode konverzije i neizdvojivu radioaktivnost;

- maseni balans u toku i na kraju ispitivanja;

- grafički prikaz tranformacije posebno u vodi i sedimentu kao i u ukupnom sistemu (uključujući i mineralizaciju);

- stope mineralizacije;

- poluživot, DT50 i ukoliko je moguće, DT75 i DT90 vrednosti za ispitivanu supstancu, i gde postoji mogućnost za glavne proizvode konverzije, uključiti i intervale poverenja u vodi sedimentu i ukupnom sistemu;

- procena kinetike transformacije ispitivane supstance, i kada je moguće glavnih proizvoda konverzije;

- predložene puteve transformacije, kada je to moguće;

- prodiskutovati rezultate.

**4. LITERATURA**

1. BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process., (1990) Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2. Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide., (1991) Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3. MAFF Pesticides Safety Directorate., (1992) Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

4. Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate., (1987) Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.

5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982) Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6. SETAC-Europe publication., (1995) Procedures for assessing the environmental fate and eCOtoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7. OECD Test Guidelines Programme., (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

8. ISO/DIS 5667-12., (1994) Water quality - Sampling - Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9. US-EPA (1998a) Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12. OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13. OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14. Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

15. Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

16. Madsen, T., Kristensen, P. (1997) Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. ToxiCOl. Chem. 16, p. 631-637.

17. Steber, J., Wierich, P. (1987) The anaerobic degradation of detergent range fatty alCOhol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, p. 661-667.

18. Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No 9. American Society of Agronomy, Madison.

19.APHA (1989) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20. Rowell, D.L. (1994) Soil Science Methods and Applications. Longman.

21. Light, T.S., (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, p. 1038-1039.

22. SETAC-Europe publication (1991) Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop 'A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests', 3-4 July 1991.

23. SETAC-Europe publication. (1993) Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop on Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24. Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997) Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, p. 2858-2868.

25. Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999) Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, p. 329-338.

26. Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985) Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ Conditions. Soil Biol. Biochem. 17, p. 197-203.

27. ISO-14240-2., (1997) Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigationextraction method.

28. Beelen, P. Van and F. Van Keulen., (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), p. 13-21.

29. Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, p. 850-857.

30. Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, p. 1527-1550.

31. Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993) Anaerobic biodegradation tests for organic Compounds. Chemoshpere 27, p. 1499-1509.

32. Nuck, B.A. and Federle, T.W., (1986) A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled Compounds under realistic anaerobic Conditions. Environ. Sci. Technol. 30, p. 3597-3603.

33. US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34. Sijm, Haller and Schrap (1997) Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption Coefficients of organic Contaminants. Bulletin Environ. Contam. ToxiCol. 58, p. 961-968.

35. Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 39, p. 187-203.

36. Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 33, p. 47-60.

37. Carlton, R.R., and Allen, R., (1994) The use of a Compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, p. 1349-1354.

**Deo drugi**

**SMERNICE ZA AEROBNE I ANAEROBNE SISTEME ZA ISPITIVANJE**

Aerobni sistem za ispitivanje

Aerobni sistem za ispitivanje opisan u ovoj metodi ispitivanja sastoji se od aerobnog vodenog sloja (tipična koncentracija kiseonika varira od 7 mg/l do 10 mg/l) i sedimentnog sloja, koji je aeroban na površini a anaerobni ispod površine (tipični prosečni redoks potencijal (Ex) u anaerobnoj zoni sedimenta varira od - 80 mV do - 190 mV). Vlažni vazduh se pušta po površini vode u svakoj inkubacionoj jedinici da bi se održao odgovarajući nivo kiseonika u svakoj gornjem delu suda.

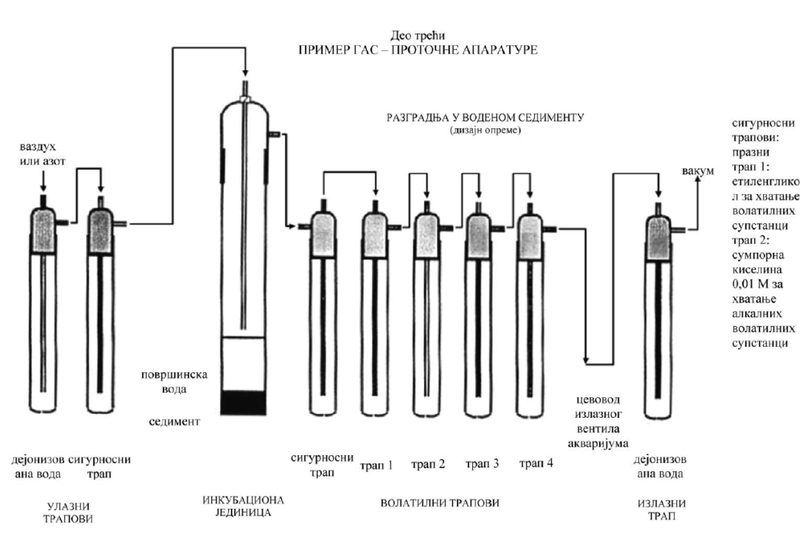
Anaerobni sistem za ispitivanje

Za anaerobne ispitivane sisteme, postupak ispitivanja je u suštini isti kao i kod opisanog aerobnog sistema, sa izuzetkom da se vlažni azot pušta po površini vode u svakoj inkubacionoj jedinici da bi se održao novo azota u gornjem delu suda. Sediment i voda se smatraju anaerobnim ako je redoks potencijal (Ex) niži od - 100 mV.

U anaerobnoj studiji, procena mineralizacije uključuje merenje ugljen dioksida i metana.

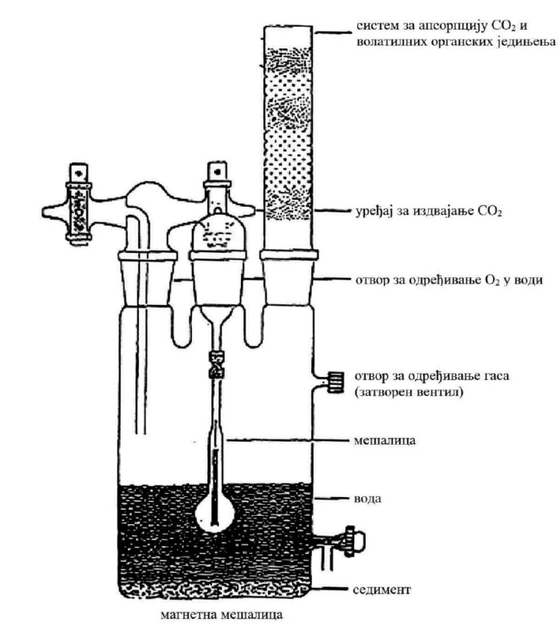
**Deo treći**

**PRIMER GAS - PROTOČNE APARATURE**



**Deo četvrti**

**PRIMER BIOMETARSKOG APARATA**



**Deo peti**

**PRIMER RAČUNANJA ZA PRIMENU DOZE NA POSUDE ZA ISPITIVANJE**

Unutrašnji promer cilindra: 8 cm

Dubina kolone sa vodom ne uključujući sediment: 12 cm

Površina: 3,142 × 42 = 50,3 cm2

Doza koja se preporučuje za primenu:

500 g ispitivane substance/ha odgovara 5 μg/cm2

Ukupno μg: 5 × 50,3 = 251,5 μg

Podesiti količinu u odnosu na dubinu od 100 cm:

12 × 251,5 ÷ 100 = 30,18 μg

Zapremina kolone sa vodom: 50,3 × 12 = 603 ml

Koncentracija u vodi: 30,18 ÷ 603= 0,050 μg/ml ili 50 μg/l

**C.25. AEROBNA MINERALIZACIJA U POVRŠINSKIM VODAMA - ISPITIVANJE BIORAZGRADNJE U SIMULACIONIM USLOVIMA**

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 309 (2004)1.

*1.1. UVOD*

Svrha ovog ispitivanja je da se odredi vreme potrebno za biorazgradnju ispitivane supstance koja je prisutna u aerobnim prirodnim vodama u niskoj koncentraciji i kvantifikuje kinetička brzina. Ovo simulaciono ispitivanje predstavlja šaržni postupak koji se izvodi u laboratorijskim uslovima u sudovima na tresilici čime se određuje brzina biorazgradnje organske supstance u aerobnim uslovima u uzorcima prirodnih površinskih voda (slatka, brakična ili morska). Zasniva se na standardu ISO 14592-1**2** a sadrži i elemente metoda ispitivanja C.23. i C.24.**3,4**. U slučaju dužeg trajanja ispitivanja, postupak se može dopuniti periodičnim dodavanjem vode (polukontinualni postupak) kako se ne bi narušio ispitivani mikrosistem. Glavni cilj simulacionog ispitivanja je određivanje mineralizacije ispitivane supstance u površinskim vodama, koja čini osnovu za određivanje kinetike razgradnje. Ispitivanje ima i fakultativni sekundarni cilj - dobijanje informacija o primarnoj razgradnji i formiranju glavnih proizvoda razgradnje. Utvrđivanje proizvoda transformacije i, ako je moguće, kvantifikovanje njihovih koncentracija je naročito važno za supstance koje se vrlo sporo mineralizuju (npr. gde vreme poluživota ukupnog preostalog 14C iznosi više od 60 dana). Zbog analitičkih ograničenja, za identifikaciju i kvantifikaciju značajnih proizvoda transformacije po pravilu koristiti više koncentracije ispitivane supstance (npr. > 100 μg/l).

U okviru ovog ispitivanja niska koncentracija podrazumeva koncentraciju dovoljno nisku (npr. manje od 1 μg/l do 100 μg/l) da se prilikom ispitivanja postigne kinetika biorazgradnje kakva se može očekivati u životnoj sredini. U poređenju sa ukupnom količinom biorazgradljivih jedinjenja ugljenika u prirodnim vodama koja se koristi u ispitivanju, niska koncentracija ispitivane supstance će služiti kao sekundarni supstrat. To znači da je očekivana kinetika biorazgradnje kinetika prvog reda (kinetika "bez rasta") i da se ispitivana supstanca može razgraditi "kometabolizmom". Kinetika prvog reda podrazumeva da je brzina razgradnje (mg/l/dan) srazmerna koncentraciji supstrata, koja opada sa vremenom. Kod prave kinetike prvog reda konstanta specifične brzine razgradnje (k) je nezavisna od vremena i koncentracije. Prema tome, k se ne menja značajnije tokom jednog eksperimenta, ali ni sa povećanjem koncentracije između eksperimenata. Prema definiciji, konstanta specifične brzine razgradnje jednaka je relativnoj promeni koncentracije po jedinici vremena: k = (1/C) × (dC/dt). Iako se u propisanim uslovima u pravilu očekuje kinetika prvog reda, u određenim okolnostima mogu više odgovarati druge vrste kinetike. Odstupanja od kinetike prvog reda mogu se zapaziti kad brzinu biorazgradnje više ograničava pojava prenosa mase, npr. brzina difuzije, nego brzina biološke reakcije. Podaci se gotovo uvek mogu opisati kinetikom pseudoprvog reda, ako se prihvati konstanta brzine koja zavisi od koncentracije.

Informacije o biorazgradljivosti ispitivane supstance pri višim koncentracijama (npr. iz standardnih brzih skrining testova) kao i podaci o abiotičkoj razgradljivosti, proizvodima transformacije i relevantnim fizičko-hemijskim svojstvima, potrebno je da budu na raspolaganju pre ispitivanja da pomognu planiranju eksperimenta i tumačenju rezultata. Sposobnost potpune biorazgradnje može se odrediti primenom 14C obeležene ispitivane supstance i određivanjem fazne raspodele 14C na kraju ispitivanja. Ako se koristi neobeležena ispitivana supstanca, konačna biorazgradnja se može proceniti samo ako se ispituje viša koncentracija i ako su poznati svi glavni proizvodi razgradnje.

*1.2. DEFINICIJE*

Primarna biorazgradnja jeste promena strukture (transformacija) hemijske supstance delovanjem mikroorganizama koja dovodi do gubitka identiteta hemikalije.

Funkcionalna biorazgradnja jeste promena strukture (transformacija) hemijske supstance delovanjem mikroorganizama koja dovodi do gubitka određenog svojstva.

Potpuna aerobna biorazgradnja jeste razgradnja hemijske supstance delovanjem mikroorganizama u prisustvu kiseonika na ugljen-dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata (mineralizacija) i stvaranje nove biomase i organskih proizvoda mikrobiološke biosinteze.

Mineralizacija jeste razgradnja hemijske supstance odnosno organskog sadržaja delovanjem mikroorganizama u prisustvu kiseonika na ugljen-dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata.

Faza prilagođavanja (lag faza) jeste vreme od početka ispitivanja koje je potrebno da se mikroorganizmi koji vrše razgradnju prilagode i da stepen biorazgradnje hemijske supstance odnosno organskog sadržaja dostigne nivo detekcije (npr. 10% maksimalne teoretske biorazgradnje ili manje, zavisno od tačnosti merne tehnike).

Maksimalna biorazgradnja jeste stepen biorazgradnje hemijske supstance odnosno organskog sadržaja u okviru ispitivanja, izražen u procentima, iznad kojeg više nema biorazgradnje tokom ispitivanja.

Primarni supstrat jeste skup organski vezanog ugljenika i izvora energije koji obezbeđuju rast i održavanje biomase mikroorganizama.

Sekundarni supstrat jeste komponenta supstrata koja je prisutna u tako niskoj koncentraciji da njenom razgradnjom relevantni mikroorganizmi primaju tek neznatne količine ugljenika i energije u odnosu na ugljenik i energiju koja se obezbeđuje razgradnjom glavnih komponenata supstrata (primarni supstrati).

Konstanta brzine razgradnje jeste konstanta brzine kinetike prvog reda ili pseudoprvog reda k (d-1), kojom se označava brzina procesa razgradnje. U slučaju šaržnih eksperimenata k se procenjuje iz početnog dela krive razgradnje dobijene po završetku faze prilagođavanja.

Vreme poluživota, t1/2 (d) jeste izraz koji se koristi za opisivanje brzine reakcije prvog reda. To je vremenski interval koji odgovara smanjenju koncentracije za faktor 2. Odnos između vremena poluživota i konstante brzine razgradnje opisan je jednačinom t1/2 = ln2/k.

Vreme polurazgradnje, DT50 (d) jeste izraz koji se koristi za kvantifikaciju rezultata ispitivanja biorazagradnje. To je vreme koje je potrebno da se dostigne 50% biorazgradnje, uključujući fazu prilagođavanja.

Granica detekcije (Limit of detection, u daljem tekstu: LOD) jeste koncentracija supstance ispod koje se supstanca više ne može razlikovati od analitičkih artefakata.

Granica kvantifikacije (Limit of quantification, u daljem tekstu: LOQ) jeste koncentracija supstance ispod koje se koncentracija ne može odrediti sa prihvatljivom tačnošću.

Rastvoreni organski ugljenik (u daljem tekstu: DOC) jeste deo organski vezanog ugljenika u uzorku vode koji se ne može ukloniti predviđenim razdvajanjem faza, npr. 15-minutnim centrifugiranjem na 40 000 ms-2 ili membranskom filtracijom pomoću membrana veličine pora 0,2 μm do 0,45 μm.

Ukupna 14C aktivnost organskog ugljenika (Total organic 14C activity, u daljem tekstu: TOA) jeste ukupna 14C aktivnost koja potiče od organski vezanog ugljenika.

14C aktivnost rastvorenog organskog ugljenika (Dissolved organic 14C activity, u daljem tekstu: DOA) jeste ukupna 14C aktivnost koja potiče od rastvorenog organski vezanog ugljenika.

14C aktivnost organskog ugljenika u čvrstom obliku (Particulate organic 14C activity, u daljem tekstu: POA) jeste ukupna 14C aktivnost koja potiče od organski vezanog ugljenika u čvrstom obliku.

*1.3. PRIMENLJIVOST ISPITIVANJA*

Simulaciono ispitivanje je primenljivo u slučaju neisparljivih i blago isparljivih organskih supstanci koje se ispituju pri niskim koncentracijama. Ako se koriste sudovi sa razmenom vazduha iz atmosfere (npr. zatvoreni čepom od vate), supstance sa Henrijevom konstantom ispod oko 1 Pa·m3/mol (oko 10-5 atm·m3/mol) mogu se u praksi smatrati neisparljivima. Ako se koriste zatvoreni sudovi za analizu supstance iz gasne faze (headspace), mogu se ispitivati i slabo isparljive supstance (sa Henrijevom konstantom < 100 Pa m3/mol ili < 1 0-3 atm·m3/mol) bez gubitaka mase iz ispitivanog sistema. Pri oslobađanju CO2 može doći do gubitaka 14C obeležene supstance ako se ne sprovedu odgovarajuće mere predostrožnosti. U takvim situacijama ponekad je potrebno odvajati CO2 na unutrašnjem apsorberu sa bazama ili koristiti spoljni apsorber sistem CO2 (direktno određivanje 14CO2; videti Dodatak treći ove metode). Za određivanje kinetike biorazgradnje, koncentracije ispitivane supstance su ispod rastvorljivosti u vodi. Ipak, imati na umu da vrednosti rastvorljivosti u vodi koje se navode u literaturi mogu biti znatno više od rastvorljivosti ispitivane supstance u prirodnim vodama. Rastvorljivosti ispitivanih supstanci koje su izrazito slabo rastvorljive u vodi mogu se utvrditi i pomoću prirodnih voda koje se ispituju.

Metoda se može koristiti za simulaciju biorazgradnje u površinskim vodama bez krupnih čestica (pelagički test) ili u mutnim površinskim vodama kakva se npr. može naći u blizini međuprostora voda/sediment (ispitivanje sa suspendovanim sedimentom).

*1.4. PRINCIP ISPITIVANJA*

Ispitivanje se sprovodi u šaržama inkubiranjem ispitivane supstance bilo samo sa površinskom vodom (pelagički test) ili sa površinskom vodom kojoj je dodata suspendovana čvrsta supstanca/sediment u koncentraciji od 0,01 g/l do 1 g/l suve mase (ispitivanjem sa suspendovanim sedimentom) radi simulacije vodene sredine sa suspendovanim čvrstim supstancama ili resuspendovanim sedimentom. Koncentracija suspendovane čvrste supstance/sedimenta u donjem opsegu ovog intervala tipična je za većinu površinskih voda. Sudovi sa ispitivanim uzorkom se inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi u aerobnim uslovima, uz mućkanje. Za određivanje kinetike razgradnje koriste se najmanje dve koncentracije ispitivane supstance. Koncentracije se razlikuju za faktor 5 do 10 i predstavljaju očekivani opseg koncentracija u životnoj sredini. Maksimalna koncentracija ispitivane supstance ne sme biti viša od 100 µg/l, a poželjno je da maksimalne ispitivane koncentracije budu od 10 µg/l ili niže kako bi se obezbedilo da biorazgradnja bude u skladu sa kinetikom prvog reda. Najniža koncentracija ne sme biti viša od 10 µg/l, a prednost dati koncentracijama 1 µg/l do 2 µg/l ili manje od 1 µg/l. Obično se tako niske koncentracije mogu dovoljno dobro analizirati upotrebom 14S obeleženih supstanci koje su dostupne na tržištu. Ako se ispitivana supstanca primenjuje u koncentraciji ≤ 100 µg/L, koncentraciju često nije moguće izmeriti sa potrebnom tačnošću zbog analitičkih ograničenja (videti odeljak 1.7.2. ove metode). Više koncentracije ispitivane supstance (> 100 µg/L, a ponekad i > 1 mg/L) mogu se koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju glavnih proizvoda transformacije i u slučajevima kad nije raspoloživa specifična analitička metoda sa niskom granicom detekcije. Ako se ispituju visoke koncentracije ispitivane supstance, ponekad nije moguće odrediti konstantu brzine razgradnje prvog reda i vreme poluživota na osnovu dobijenih rezultata budući da razgradnja verovatno neće slediti kinetiku prvog reda.

Razgradnja se prati u odgovarajućim vremenskim razmacima, merenjem preostalog 14C ili preostale koncentracije ispitivane supstance, ako se vrši specifična hemijska analiza.14C obeležavanjem najstabilnijeg dela molekula može se odrediti ukupna mineralizacija, dok se 14C obeležavanjem manje stabilnog dela molekula i primenom specifične analize može odrediti samo primarna biorazgradnja. Međutim, najstabilniji deo ne uključuje obavezno relevantni funkcionalni deo molekula (koji je povezan sa specifičnim svojstvom, kao što su toksičnost, bioakumulacija itd). U tom slučaju, kod ispitivanja je možda primerenije koristiti ispitivanu supstancu 14C obeleženu u funkcionalnom delu da bi se pratio gubitak specifičnog svojstva.

*1.5. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Za ovo ispitivanje mogu se koristiti i radioaktivno obeležene i neobeležene ispitivane supstance. Preporučuje se 14C tehnika obeležavanja, i po pravilu se nalazi na najstabilnijem delu ili delovima molekula (videti i odeljak 1.4. ove metode). Kod supstanci koje sadrže više od jednog aromatičnog prstena po mogućstvu 14C obeležiti jedan ili više ugljenika u svakom prstenu. Osim toga, poželjno je 14C obeležiti jedan ili više ugljenika sa obe strane lako razgradljivih veza. Hemijska i/ili radioaktivna čistoća ispitivane supstance je > 95%. Kod radioaktivno obeleženih supstanci, poželjna je specifična aktivnost od oko 50 μCi/mg (1,85 MBq) ili više, kako bi se olakšala merenja 14C kod ispitivanja sa niskim početnim koncentracijama. Potrebne su sledeće informacije o ispitivanoj supstanci:

- rastvorljivost u vodi (metoda A.6. koja je data u ovom pravilniku),

- rastvorljivost u organskom rastvaraču ili rastvaračima (ako se supstanca primenjuje pomoću rastvarača ili ima nisku rastvorljivost u vodi),

- konstanta disocijacije (pKa), ako je supstanca podložna protonizaciji ili deprotonizaciji (Uputstvo za ispitivanje OECD TG 112)5,

- napon pare (metoda A.4. koja je data u ovom pravilniku) i Henrijeva konstanta,

- hemijska stabilnost u vodi i u mraku (hidroliza) (metoda C.7. koja je data u ovom pravilniku).

Ako se supstance koje su slabo rastvorljive u vodi ispituju u morskoj vodi, korisno je znati konstantu isoljavanja (ili "Sečenovu konstantu") Ks, koja se definiše izrazom: log (S/S') = Ks Cm, gde su S i S' rastvorljivosti supstance u slatkoj, odnosno morskoj vodi, a Cm je molarna koncentracija soli.

Ako se ispitivanje obavlja kao ispitivanje sa suspendovanim sedimentom, dostupne su i sledeće informacije:

- koeficijent raspodele - oktanol/voda (metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku),

- koeficijent adsorpcije (metoda C.18. koja je data u ovom pravilniku).

Ostale korisne informacije mogu da obuhvataju:

- koncentracija u životnoj sredini, ako je poznata ili procenjena,

- toksičnost ispitivane supstance za mikroorganizme (metoda C.11. koja je data u ovom pravilniku),

- laka i/ili inherentna biorazgradljivost (metode C.4 A-F, C.12. i C.9. koje su date u ovom pravilniku, Uputstvo za ispitivanje OECD TG 302**5**),

- aerobna ili anaerobna biorazgradljivost u zemljištu i studije transformacije u sistemima voda-sediment (metode C.23. i C.24. koje su date u ovom pravilniku).

*1.6. REFERENTNA SUPSTANCA*

Kao referentnu supstancu koristiti supstancu koja se po pravilu lako razgrađuje u aerobnim uslovima (npr. anilin ili natrijum benzoat). Očekivano vreme razgradnje anilina i natrijum benzoata obično je kraće od 2 nedelje. Svrha korišćenja referentnih supstanci je da se proveri se da li se mikrobiološka aktivnost u ispitivanoj vodi kreće unutar određenih granica, tj. da li voda sadrži aktivnu mikrobiološku populaciju.

*1.7. KRITERIJUMI KVALITETA*

**1.7.1. Efikasnost primenjene analitičke tehnike**

Svaku početnu koncentraciju proveriti odmah nakon dodavanja ispitivane supstance u najmanje dva ponavljanja merenjem 14C aktivnosti ili, u slučaju neobeleženih supstanci, hemijskom analizom. Time se dobijaju informacije o primenljivosti i ponovljivosti analitičke metode i homogenosti raspodele ispitivane supstance. Kod kasnijih analiza podataka obično se ne koristi nominalna koncentracija već izmerena početna 14C aktivnost odnosno izmerena koncentracija ispitivane supstance, jer se time ispravljaju gubici usled sorpcije i greške u doziranju. Kod 14C obeležene supstance efikasnost na kraju eksperimenta proizlazi iz bilansa mase (videti odeljak 1.8.9.4. ove metode). U idealnom slučaju bilans mase radioaktivno obeležene supstance kreće se u opsegu od 90% do 110% dok analitička tačnost kod neobeleženih ispitivanih supstanci je takva da se dobije početna efikasnost u opsegu od 70% do 110%. Ove opsege shvatiti kao ciljne vrednosti, a ne kao kriterijum za prihvatanje ispitivanja. Analitička tačnost se može opciono odrediti pri koncentraciji ispitivane supstance koja je niža od početne kao i za glavne proizvode transformacije.

**1.7.2. Ponovljivost i osetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode (uključujući efikasnost početne ekstrakcije) za kvantifikaciju ispitivane supstance i proizvoda transformacije (prema potrebi) proveriti analizom pojedinačnih ekstrakata površinske vode u pet ponavljanja.

Granica detekcije (LOD) analitičke metode za ispitivanu supstancu i proizvode transformacije po mogućstvu je najmanje 1% od početne količine koja je primenjena na sistem za ispitivanje. Granica kvantifikacije (LOQ) je jednaka ili manja od 10% od primenjene koncentracije. Za hemijske analize mnogih organskih supstanci i njihovih proizvoda transformacije često su potrebne relativno visoke koncentracije ispitivane supstance tj. > 100 μg/L.

*1.8. OPIS METODE ISPITIVANJA*

**1.8.1. Oprema**

Ispitivanje se može obaviti u erlenmajerima ili bocama odgovarajuće zapremine (npr. 0,5 litar ili 1,0 litar) zatvorenim silikonskim ili gumenim čepovima ili u serumskim bocama sa zatvaračima koji ne propuštaju CO2 (npr. sa zatvaračem od butilne gume). Druga mogućnost je da se ispitivanje sprovede tako što se upotrebi veći broj sudova i uzima se čitav sadržaj suda za analizu, najmanje dva ponavljanja za svaki interval uzorkovanja (videti odeljak 1.8.9.1. ove metode). Kod neisparljivih ispitivanih supstanci koje nisu radioaktivno obeležene nisu potrebni čepovi ili zatvarači koji ne propuštaju gas; dovoljno ih je zatvoriti vatom koja sprečava zagađenje iz vazduha (videti odeljak 1.8.9.1. ove metode). Blago isparljive supstance ispitati u sistemu biometarskog tipa uz blago mešanje vodene površine. Da bi se izbeglo zagađenje bakterijama, sudovi se mogu pre upotrebe sterilisati suvom sterilizacijom ili parom u autoklavu. Osim toga, koristi se sledeća standardna laboratorijska oprema:

- tresilica ili magnetne mešalice za neprekidno mućkanje sudova sa uzorcima,

- centrifuga,

- pH-metar,

- turbidimetar za nefelometrijska merenja zamućenosti,

- peć za žarenje ili mikrotalasna peć za pripremu uzorka za određivanje suve supstance,

- sistem za membransku filtraciju,

- autoklav ili suvi sterilizator za termičku sterilizaciju staklene opreme,

- oprema za rukovanje 14C obeleženim supstancama,

- oprema za kvantifikaciju 14C aktivnosti u uzorcima iz rastvora za izdvajanje CO2 i, po potrebi, iz uzoraka sedimenta,

- analitička oprema za određivanje ispitivane (i referentne) supstance, ako se koristi specifična hemijska analiza (npr. gasni hromatograf, tečni hromatograf pod visokim pritiskom).

**1.8.2. Radni rastvori ispitivane supstance**

Za pripremu radnih rastvora ispitivanih i referentnih supstanci koristiti dejonizovanu vodu (videti odeljak 1.8.7. ove metode). U dejonizovanoj vodi ne sme biti supstanci koje bi mogle biti toksične za mikroorganizme, a udeo rastvorenog organskog ugljenika (DOC) ne sme biti viši od 1 mg/L**6**.

**1.8.3. Uzorkovanje i transport uzoraka površinskih voda**

Mesto za uzorkovanje površinskih voda odabrati u skladu sa svrhom ispitivanja u svakoj datoj situaciji. Kod izbora mesta za uzorkovanje uzeti u obzir moguću istoriju unosa materijala iz poljoprivrede, industrije i domaćinstava. Voda za ispitivanje ne sme se skupljati na mestima za koja se zna da su u prethodne četiri godine bila zagađena ispitivanom supstancom ili njenim strukturnim analozima, osim ako je svrha istraživanja da se ispita brzina razgradnje na zagađenim lokacijama. Na mestu uzorkovanja izmeriti pH vrednost i temperaturu vode. Pored toga, zabeležiti dubinu uzorkovanja i izgled vodenog uzorka (npr. boja i mutnoća) (videti odeljak 3. ove metode). Da bi se dokazali aerobni uslovi, izmeriti koncentraciju kiseonika i/ili redoks potencijal u vodi i površinskom sloju sedimenta, osim ako je to očigledno u odnosu na izgled i ranija iskustva sa ovom lokacijom. Površinsku vodu prevoziti u temeljno očišćenim bocama. Za vreme transporta, temperatura uzorka ne sme biti značajno viša od temperature ispitivanja. Ako transport traje više od 2 do 3 sata, preporučuje se hlađenje na 4 °C.

**1.8.4. Skladištenje i priprema uzoraka površinske vode**

Ispitivanje po mogućstvu započeti u roku od jednog dana od uzimanja uzorka. Skladištenje vode, ako je potrebno, svesti na najmanju moguću meru, a u svakom slučaju ne sme da traje duže od 4 nedelje. Vodeni uzorak do upotrebe držati na temperaturi od 4° C, uz provetravanje. Pre upotrebe ukloniti krupne čestice npr. filtriranjem kroz filter veličine pora od 100 μm kroz grubi filter-papir ili taloženjem.

**1.8.5. Priprema vode sa sedimentom (opciono)**

Kod ispitivanja sa suspendovanim sedimentom, površinski sediment se dodaje u uzorke koje sadrže prirodnu vodu (koja je prethodno filtrirana radi uklanjanja krupnih čestica, kako je opisano u odeljku 1.8.4. ove metode) da se dobije suspenzija pri čemu je koncentracija suspendovane čvrste supstance između 0,01 i 1 g/L. Površinski sediment potiče sa istog mesta kao i vodeni uzorak. Zavisno od konkretne vodene sredine, površinski sediment može imati visok sadržaj organskog ugljenika (2,5% do 7,5%) i finu teksturu ili nizak sadržaj organskog ugljenika (0,5% do 2,5%) i grubu teksturu**3**. Površinski sediment se može pripremiti na sledeći način: uz pomoć providne plastične cevčice izvuče se nekoliko sedimentnih jezgara; odmah nakon uzorkovanja odstrane se gornji aerobni slojevi (od površine do dubine od najviše 5 mm) i sastave. Dobijeni uzorak sedimenta se transportuje u sudu sa velikim vazdušnim prostorom kako bi se osigurali aerobni uslovi (uz hlađenje na 4 °C ako prevoz traje više od 2 odnosno 3 sata). Uzorak sedimenta se suspenduje u uzorku ispitivane vode u razmeri 1:10 i drži do upotrebe na temperaturi od 4 °C uz provetravanje. Skladištenje sedimenta, ako je ono potrebno, svesti na najmanju moguću meru, a u svakom slučaju ne sme da traje duže od 4 nedelje.

**1.8.6. Polukontinuirani postupak (opciono)**

Inkubaciju je ponekad potrebno produžiti (na nekoliko meseci) ako se značajna razgradnja ispitivane supstance izmeri tek nakon dugog vremena prilagođavanja. Ako je to poznato iz ranijeg ispitivanja supstance, ispitivanje se može započeti polukontinuiranim postupkom, koji omogućava periodično obnavljanje dela uzorka ispitivane vode odnosno suspenzije (videti Dodatak drugi ove metode). Druga mogućnost je da se uobičajeno šaržno ispitivanje pretvori u polukontinuirano ako tokom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane supstance (videti odeljak 1.8.8.3. ove metode).

**1.8.7. Dodavanje ispitivane (ili referentne) supstance**

Kada su u pitanju supstance visoke rastvorljivosti u vodi (> 1 mg/L) i niske isparljivosti (Henrijeva konstanta < 1 Pa·m3/mol ili < 10-5 atm·m3/mol) može se pripremiti radni rastvor u dejonizovanoj vodi (videti odeljak 1.8.2. ove metode); u uzorke za ispitivanje se doda odgovarajuća zapremina radnog rastvora da bi se dobila željena koncentracija. Zapreminu svakog dodatog radnog rastvora koji se dodaje u posudu svesti na najmanju moguću meru (po mogućstvu < 10% konačne zapremine tečnosti). Druga mogućnost je da se ispitivana supstanca rastvori u većoj zapremini ispitivane vode, što se može smatrati zamenom za korišćenje organskih rastvarača.

Ako kod pripreme radnih rastvora neisparljivih supstanci koje su slabo rastvorljive u vodi nije moguće izbeći primenu rastvarača, koristiti isparljive organske rastvarače, s tim da količina rastvarača koja se unosi u sistem za ispitivanje ne sme biti viša od 1% v/v i ne sme imati štetne efekte po mikrobiološku aktivnost. Rastvarač ne sme uticati na stabilnost ispitivane supstance u vodi. Rastvarač se odstrani do najmanje moguće količine kako ne bi došlo do značajnog povećanja koncentracije DOC u ispitivanoj vodi, odnosno suspenziji. Ovo proveriti specifičnom analizom supstanci odnosno, ukoliko je to moguće, analizom DOC**6**. Treba voditi računa da se preneta količina rastvarača svede na najmanju neophodnu meru i uveriti se da se prisutna količina ispitivane supstance može rastvoriti u konačnoj zapremini ispitivane vode. Mogu se koristiti i druge tehnike za uvođenje ispitivane supstance u uzorke**7,8**. Ako se za uvođenje ispitivane supstance koristi organski rastvarač, uvesti kontrole sa rastvaračem koje sadrže ispitivanu vodu (bez drugih dodataka) i ispitivanu vodu sa referentnom supstancom i sa njima postupati na sličan način kao sa aktivnim uzorcima za ispitivanje u koje je dodata ispitivana supstanca u rastvaraču. Svrha kontrola sa rastvaračem je da se ispitaju mogući štetni uticaji rastvarača na mikrobiološku populaciju na osnovu razgradnje referentne supstance.

**1.8.8. Uslovi ispitivanja**

*1.8.8.1. Temperatura ispitivanja*

Inkubacija se sprovodi u mraku (poželjno) ili pod difuznom rasvetom na kontrolisanoj temperaturi (± 2° C), koja može da odgovara temperaturi na terenu ili standardnoj temperaturi od 20° C do 25° C. Temperatura na terenu može biti stvarna temperatura uzorka u trenutku uzorkovanja ili prosečna temperatura na mestu uzorkovanja.

*1.8.8.2. Mućkanje*

Čestice i mikroorganizme držati u suspenziji neprekidnim mućkanjem tj trešenjem ili mešanjem. Mućkanjem se olakšava i prenos kiseonika iz vazdušnog prostora u tečnost i tako obezbeđuju potrebni aerobni uslovi. Sudovi se stave na tresilicu (oko 100 o/min) ili se koristi magnetna mešalica. Trešenje odnosno mešanje je što je moguće blaže, ali istovremeno voditi računa da se održi homogenost suspenzije.

*1.8.8.3. Trajanje ispitivanja*

Ispitivanje uglavnom ne sme da traje duže od 60 dana, osim ako se primenjuje polukontinuirani postupak sa periodičnim obnavljanjem ispitivane suspenzije (videti odeljak 1.8.6. i Dodatak drugi ove metode). Međutim, vreme ispitivanja se i kod primene šaržnog postupka može produžiti do najviše 90 dana ukoliko je razgradnja ispitivane supstance započela u prvih 60 dana. Razgradnja se prati u odgovarajućim vremenskim razmacima određivanjem preostale 14C aktivnosti odnosno nastalog 14CO2 (videti odeljak 1.8.9.4. ove metode) i/ili hemijskom analizom (videti odeljak 1.8.9.5. ove metode). Vreme inkubacije je dovoljno dugo da bi se procenio proces razgradnje. Poželjno je da stepen razgradnje bude viši od 50%; kod supstanci koje se sporo razgrađuju stepen razgradnje je dovoljan (po pravilu iznad 20%) da se može proceniti konstanta kinetičke brzine razgradnje.

Vrše se periodična merenja pH vrednosti i koncentracije kiseonika u ispitivanom sistemu, osim ako zahvaljujući ranijim iskustvima sa uzorcima vode i sedimenta sa iste lokacije u sličnim ispitivanjima takva merenja nisu potrebna. U određenim uslovima usled metabolizma primarnih supstrata, koji mogu biti prisutni u vodi ili sedimentu u znatno višim koncentracijama, može doći do stvaranja povećanih količina CO2 i povećane potrošnje kiseonika, što može izazvati značajne promene eksperimentalnih uslova tokom ispitivanja.

**1.8.9. Postupak**

*1.8.9.1. Priprema uzoraka za pelagički test*

U sudove za ispitivanje se prenese odgovarajuća količina ispitivane vode, do oko jedne trećine zapremine suda, ali ne manje od oko 100 ml. I ako se koristi veći broj sudova (kako bi se u svakom vremenu uzorkovanja mogao uzimati čitav sadržaj iz suda), potrebno je oko 100 ml ispitivane vode, budući da male količine uzorka mogu uticati na dužinu faze prilagođavanja. Ispitivana supstanca se dodaje iz radnog rastvora kako je opisano u odeljku 1.8.2. i 1.8.7. ove metode. Da bi se odredila kinetika razgradnje i izračunala konstanta kinetičke brzine razgradnje, potrebne su najmanje dve različite koncentracije ispitivane supstance koje se razlikuju za faktor 5 do 10. Obe izabrane koncentracije manje su od 100 µg/L, a poželjno je da budu u opsegu od < 1 µg/ L do 10 µg/L.

Sudovi se zatvore čepovima ili poklopcima koji ne propuštaju vazduh i CO2. Ako se ispituju neisparljive hemikalije koje nisu radioaktivno obeležene, posude se mogu začepiti vatom, koja sprečava zagađenje iz vazduha (videti odeljak 1.8.1. ove metode), pod uslovom da se zna da su svi važniji proizvodi razgradnje neisparljivi i da se primenjuje indirektno određivanje CO2 (videti Dodatak treći ove metode).

Sudovi se inkubiraju na odabranoj temperaturi (videti odeljak 1.8.8.1. ove metode). Uzorci se uzimaju za hemijsku analizu ili merenje 14C na početku ispitivanja (tj. pre nego što započne razgradnja; videti odeljak 1.7.1. ove metode) i u odgovarajućim vremenskim razmacima tokom ispitivanja. Uzorkovanje se može obaviti izvlačenjem poduzoraka (npr. alikvota od 5 ml) iz svakog ponavljanja ili uzimanjem čitavog sadržaja suda u svakom vremenu uzorkovanja. Mineralizacija ispitivane supstance može se odrediti indirektno ili direktno (videti Dodatak treći ove metode). Obično je za pouzdano određivanje konstante brzine potrebno najmanje pet tačaka uzorkovanja u fazi razgradnje (tj. nakon završetka faze prilagođavanja), osim u slučaju brzo razgradljivih supstanci, kada se uz odgovarajuće obrazloženje mogu dopustiti i tri tačke uzorkovanja. Kod supstanci koje nisu brzo razgradljive u fazi razgradnje se bez problema može obaviti više merenja i stoga za procenu k koristiti više tačaka podataka. Nije moguće navesti tačan vremenski raspored uzorkovanja budući da su brzine biorazgradnje različite; ipak, preporučuje se da se u slučaju spore razgradnje uzorkovanje vrši jedanput nedeljno. Ako se ispitivana supstanca brzo razgrađuje, uzorkovanje obavljati jedanput dnevno u prva tri dana, a zatim svaki drugi ili treći dan. U određenim okolnostima, npr. u slučaju supstanci koje vrlo brzo hidrolizuju, ponekad je potrebno uzimati uzorke na svakih sat vremena. Preporučuje se da se pre ispitivanja obavi preliminarna proba kako bi se odredili odgovarajući intervali uzorkovanja. Ako se uzorci čuvaju za dalju specifičnu analizu, preporučljivo je da se uzme više uzoraka i zatim na kraju eksperimenta izaberu oni koji će se analizirati obrnutim redosledom tj. prvo se analiziraju uzorci koji su uzeti poslednji (za smernice o stabilnosti uzoraka tokom skladištenja videti odeljak 1.8. ove metode).

*1.8.9.2. Broj sudova i uzoraka*

Pripremi se dovoljan broj sudova za ispitivanje tako da se dobiju:

- sudovi za ispitivanje; najmanje dva suda (tj. dva ponavljanja) za svaku koncentraciju ispitivane supstance (poželjno je tri suda tj. tri ponavljanja) ili veći broj sudova za ispitivanje za svaku ispitivanu koncentraciju, ako se u svakom vremenu uzorkovanja uzima čitav sadržaj suda (označeni kao FT);

- sudovi za izračunavanje bilansa mase; najmanje dva suda za svaku ispitivanu koncentraciju (označene kao FM);

- slepa proba, bez ispitivane supstance; najmanje jedan sud za slepu probu koja sadrži samo vodu za ispitivanje (označena kao FB);

- kontrola sa referentnom supstancom; dva suda sa referentnom supstancom (npr. anilin ili natrijum benzoat, 10 µg/l) (označene kao FC). Svrha kontrole sa referentnom supstancom je da se potvrdi minimalna mikrobiološka aktivnost. Ako je praktično, može se koristiti radioaktivno obeležena referentna supstanca i onda kada se razgradnja ispitivane supstance prati hemijskim analizama;

- sterilna kontrola; jedan ili dva suda koje sadrže sterilizovanu vodu za ispitivanje radi provere moguće abiotičke razgradnje ili drugog nebiološkog uklanjanja ispitivane supstance (označene kao FS). Biološka aktivnost se može prekinuti sterilizacijom uzorka u autoklavu (121° C; 20 min), dodavanjem toksične supstance (npr. natrijum-azid (NaN3) u koncentraciji 10 g/l do 20 g/l, živa-(II) hlorid (HgCl2) u koncentraciji 100 mg/l ili formalin u koncentraciji 100 mg/l) ili gama zračenjem. Ako se koristi HgCl2 on se zbrinjava kao toksični otpad. U vodi u kojoj je dodata velika količina sedimenta nije lako postići sterilne uslove; u tom slučaju preporučuje se ponovljena sterilizacija u autoklavu (npr. tri puta). Uzeti u obzir da se adsorpciona svojstva sedimenta mogu promeniti sterilizacijom u autoklavu;

- kontrole sa rastvaračem, koje sadrže vodu za ispitivanje i vodu za ispitivanje sa referentnom supstancom; po dva suda koja su obrađena istom količinom rastvarača uz primenu istog postupka kao u slučaju ispitivane supstance. Svrha ove kontrole je da se ispitaju mogući štetni efekti rastvarača kod određivanja razgradnje referentne supstance.

Kod planiranja ispitivanja uzeti u obzir relativnu važnost povećanog broja ponavljanja u odnosu na povećani broj uzorkovanja. Tačan broj sudova zavisi od metode merenja razgradnje (videti odeljak 1.8.9.1, odeljak 1.8.9.4. i Dodatak treći ove metode).

U svakom vremenu uzorkovanja iz svakog ispitivanog suda uzeti po dva poduzorka (npr. alikvote od 5 ml). Ako se koristi veći broj sudova radi uzorkovanja čitavog sadržaja suda u svakom vremenu uzorkovanja uzeti najmanje dva suda (videti odeljak 1.8.9.1. ove metode).

*1.8.9.3. Priprema sudova za ispitivanje sa suspendovanim sedimentom (opciono)*

U sudove za ispitivanje dodaju se potrebne zapremine vode za ispitivanje i sedimenta (po potrebi videti odeljak 1.8.5. ove metode). Priprema sudova za ispitivanje sa suspendovanim sedimentom je ista kao kod pelagičkog testa (videti odeljak 1.8.9.1. i 1.8.9.2. ove metode). Poželjno je koristiti serumske boce ili sudove sličnog oblika. Zatvoreni sudovi se polažu vodoravno na tresilicu. Naravno, otvorene sudove za neisparljive supstance koje nisu radioaktivno obeležene staviti u uspravan položaj; u ovom slučaju preporučuje se upotreba magnetne mešalice sa magnetima obloženim staklom. Boce prema potrebi provetravati kako bi se održali potrebni aerobni uslovi.

*1.8.9.4. Radiohemijska određivanja*

Dobijeni 14CO2 se meri indirektno i direktno (videti Dodatak treći ove metode). Indirektno određivanje 14CO2 se zasniva na razlici između početne aktivnosti 14C u vodi za ispitivanje odnosno suspenziji i ukupne preostale aktivnosti u vremenu uzorkovanja, koja se meri nakon zakiseljavanja uzorka na pH 2-3 i izlučivanja CO2. Time je neorganski ugljenik uklonjen i preostala izmerena aktivnost potiče od organskog materijala. Indirektno određivanje 14CO2 ne koristiti ako transformacijom ispitivane supstance nastaju isparljive supstance kao glavni proizvodi (videti Dodatak treći ove metode). 14CO2 po mogućstvu meriti direktno (videti Dodatak treći ove metode) u najmanje jednom od ponavljanja u svakom vremenu uzorkovanja. Ovaj postupak omogućava da se proveri i bilans mase i proces biorazgradnje, ali je ograničen na ispitivanja koja se vrše sa zatvorenim sudovima.

Ako se dobijeni 14CO2 meri direktno tokom ispitivanja, na početku ispitivanja pripremiti veći broj sudova. Direktno određivanje 14CO2 preporučuje se ako se transformacijom ispitivane supstance dobijaju isparljive supstance kao glavni proizvodi. Dodatni sudovi za ispitivanje se u svakoj tački merenja zakisele na pH 2-3 i 14CO2 se skuplja na unutrašnjem ili spoljnom apsorberu (videti Dodatak treći ove metode).

Koncentracije 14C obeležene ispitivane supstance i glavni proizvodi transformacije mogu se opciono odrediti primenom radiohromatografije (npr. tankoslojna hromatografija, RAD-TLC) ili HPLC sa radiohemijskom detekcijom.

Isto tako može se odrediti fazna raspodela preostale radioaktivnosti (videti Dodatak prvi) i preostala ispitivana supstanca i proizvodi transformacije.

Na kraju ispitivanja odrediti bilans mase direktnim merenjem 14CO2 u posebnim sudovima za ispitivanje iz kojih se ne uzimaju uzorci tokom ispitivanja (videti Dodatak treći ove metode).

*1.8.9.5. Specifična hemijska analiza*

Ako je raspoloživa osetljiva metoda za specifičnu hemijsku analizu, primarna biorazgradnja se može odrediti merenjem ukupne preostale koncentracije ispitivane supstance umesto upotrebe tehnika radioaktivnog obeležavanja. Ako se koristi radioaktivno obeležena ispitivana supstanca (za merenje ukupne mineralizacije), specifična hemijska analiza se može vršiti paralelno kako bi se dobile dodatne informacije i proverio postupak. Osim toga, specifičnom hemijskom analizom mogu se meriti proizvodi transformacije nastali razgradnjom ispitivane supstance, a to se u svakom slučaju preporučuje u slučaju supstanci koje se mineralizuju sa vremenom poluživota preko 60 dana. U svakom vremenu uzorkovanja izmeriti i dokumentovati koncentraciju ispitivane supstance i proizvode transformacije (kao koncentraciju i kao procenat od primenjene koncentracije). Po pravilu, u svakom vremenu uzorkovanja potrebno je identifikovati proizvode transformacije koji su određeni na nivou od 10% od primenjene koncentracije, osim ako postoje opravdani razlozi da se to ne učini. Takođe razmisliti o identifikaciji proizvoda konverzije čije se koncentracije stalno povećavaju tokom istraživanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze gore spomenuti prag, jer to može ukazivati na otpornost. Ako se smatra da bi moglo doći do brze abiotičke transformacije ispitivane supstance (npr. hidroliza), razmisliti o analiziranju proizvoda transformacije u sterilnim kontrolama. Potrebu kvantifikacije i identifikacije proizvoda transformacije razmotriti za svaki slučaj posebno i u izveštaju navesti odgovarajuće obrazloženje. Postupci ekstrakcije organskim rastvaračem primenjuju se u skladu sa uputstvima datim u odgovarajućoj analitičkoj metodi.

Sve uzorke skladištiti na temperaturi od 2° C do 4° C bez pristupa vazduha, ako će se analiza obaviti u roku od 24 sata (poželjno). Za duže skladištenje uzorke zamrznuti ispod - 18° C ili hemijski konzervisati. Konzervisanje uzoraka zakišeljavanjem se ne preporučuje jer zakišeljeni uzorci mogu biti nestabilni. Ako se uzorci neće analizirati u roku od 24 sata i potrebno ih je duže skladištiti, sprovodi se istraživanje stabilnosti u uslovima skladištenja kako bi se dokazala stabilnost hemikalija na temperaturama ispod - 18°C odnosno u uslovima konzervisanja. Ako analitička metoda podrazumeva ekstrakciju rastvaračem ili ekstrakciju čvrste faze (SPE), ekstrakciju obaviti neposredno nakon uzorkovanja ili nakon hladnog skladištenja u trajanju od najviše 24 sata.

Zavisno od osetljivosti analitičke metode, ponekad su potrebne veće zapremine uzoraka od onih koji su navedeni u odeljku 1.8.1. ove metode. Ispitivanje se može lako obaviti sa zapreminama od jednog litra u sudovima od 2 do 3 litra, što omogućava uzimanje uzoraka od oko 100 ml.

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

*2.1. OBRADA REZULTATA*

**2.1.1. Grafički prikaz podataka**

Vremena uzorkovanja zaokružiti na ceo broj sati (osim ako se supstanca značajno razgrađuje u nekoliko minuta ili sati), ali ne i na ceo broj dana. Napravi se linearni i polulogaritamski prikaz procenjenih vrednosti preostale aktivnosti ispitivane supstance (za 14C obeležene supstance) odnosno preostale koncentracije (za neobeležene supstance) u zavisnosti od vremena (videti Slike 1a. i 1b. koje su date u Dodatku trećem ove metode). Ako je došlo do razgradnje, rezultati uzoraka FT se uporede sa rezultatima uzoraka FS. Ako se srednje vrednosti rezultata uzoraka sa ispitivanom supstancom (FT) i sterilnih uzoraka (FS) razlikuju za manje od 10%, može se pretpostaviti da je zapažena razgradnja pretežno abiotička. Ako je razgradnja u uzorcima FS manja, dobijeni rezultati se mogu upotrebiti za korekciju rezultata uzoraka FT (oduzimanjem) i procenu stepena biorazgradnje. Ako se vrše opcione analize značajnih proizvoda transformacije, osim grafičkog prikaza opadanja ispitivane supstance prikazati formiranje i opadanje proizvoda transformacije.

Trajanje faze prilagođavanja tL proceni se iz krive razgradnje (polulogaritamski prikaz) ekstrapolacijom linearnog dela krive do nulte razgradnje ili, kao druga mogućnost, određivanjem vremena koje je potrebno da se postigne približno 10% razgradnje (videti Slike 1a. i 1b). Iz polulogaritamskog grafika proceni se konstanta brzine prvog reda, k, i njena standardna greška linearnom regresijom ln (preostala aktivnost 14C ili koncentracija ispitivane supstance) u zavisnosti od vremena. Posebno kad su u pitanju 14C merenja koristiti samo podatke iz početnog linearnog dela krive po završetku faze prilagođavanja; pri tom birati pre manji broj reprezentativnih podataka nego veći broj nesigurnih podataka. U ovom smislu nesigurnost podrazumeva i greške vezane za preporučeno direktno korišćenje izmerenih vrednosti preostale 14C aktivnosti (videti u daljem tekstu). Ponekad može biti relevantno da se izračunaju dve različite konstante brzine ako se razgradnja odvija u dve faze. Za to je potrebno definisati dve različite faze krive razgradnje. Ako se uzimaju uzorci iz istog suda, konstantu brzine, k, i vreme poluživota t1/2 = ln2/k izračunati za svaki pojedinačni sud, dok se u slučaju uzorkovanja celokupnog sadržaja suda za izračunavanje koriste prosečne vrednosti (videti poslednji stav odeljka 1.8.9.2. ove metode). Ako se koristi prvi postupak, konstantu brzine i vreme poluživota navesti odvojeno za svaki pojedinačni sud i kao prosečnu vrednost sa standardnom greškom. Ako se koriste visoke koncentracije ispitivane supstance, kriva razgradnje može znatno odstupati od pravca (polulogaritamski grafik) i možda neće važiti kinetika prvog reda. U tom slučaju nema smisla određivati vreme poluživota. Za ograničeni opseg podataka moguće je primeniti kinetiku pseudoprvog reda i proceniti vreme polurazgradnje DT50 (vreme potrebno da se postigne 50% razgradnje). Pri tome ipak imati na umu da nije moguće predvideti vremenski tok razgradnje izvan izabranog opsega podataka na osnovu tog DT50 jer se radi o vrednosti koja opisuje samo određeni skup podataka. Računarski softveri koji olakšavaju statističke proračune i linearizaciju kriva su lako dostupni pa se stoga preporučuje korišćenje takvih softvera.

Ako se vrše specifične hemijske analize, proceniti konstante brzine i vremena poluživota za primarnu razgradnju na način kako je je gore opisano za ukupnu mineralizaciju. Ako je primarna razgradnja ograničavajući proces, ponekad se mogu koristiti tačke podataka iz čitavog toka razgradnje. To je stoga što se ovde vrše direktna merenja za razliku od merenja 14C aktivnosti.

Ako se koriste 14C obeležene supstance bilans mase izraziti kao procenat primenjene početne koncentracije bar na kraju ispitivanja.

**2.1.2. Preostala aktivnost**

Kad se deo 14C obeležene organske supstance biološki razgrađuje, najveći deo 14C prelazi u 14CO2, dok se drugi deo troši na rast biomase i/ili sintezu vanćelijskih metabolita. Prema tome, krajnja biorazgradnja supstance ne dovodi do 100%-tnog prelaska njenog ugljenika u 14CO2. 14C ugrađen u proizvode biosinteze se kasnije polako oslobađa kao 14CO2 usled sekundarne mineralizacije. Iz tih razloga na grafičkim prikazima preostale aktivnosti organskog 14C (izmerene nakon izlučivanja CO2) odnosno nastalog 14CO2 u zavisnosti od vremena vide se "repovi" po završetku razgradnje. Ovo komplikuje kinetičko tumačenje podataka i stoga za procenu konstante brzine razgradnje po pravilu koristiti samo početni deo krive (po završetku faze prilagođavanja, a pre nego što se postigne približno 50% razgradnje). Ako se ispitivana supstanca razgrađuje, ukupna preostala aktivnost organskog 14C je uvek viša od aktivnosti 14C povezane sa preostalom nepromenjenom ispitivanom supstancom. Ako se ispitivana supstanca razgrađuje reakcijom prvog reda i ako se stalni udeo α mineralizuje u CO2, početni nagib krive nestajanja 14C (ukupni organski 14C u vremenu) biće α puta nagib odgovarajuće krive za koncentraciju ispitivane supstance (ili tačnije dela ispitivane supstance obeležene sa 14C). Prema tome, korišćenjem nekorigovanih vrednosti merenja ukupne aktivnosti organskog 14C dobija se konzervativna procena konstante brzine razgradnje. Postupci za procenu koncentracija ispitivane supstance iz izmerene radiohemijske aktivnosti na osnovu različitih pojednostavljujućih pretpostavki opisani su u literaturi**2,9,10,11**. Takvi postupci se najlakše primenjuju kod brzo razgradljivih supstanci.

*2.2. TUMAČENJE REZULTATA*

Ako se utvrdi da k ne zavisi od povećanja koncentracije (tj. ako je izračunata k vrednost približno jednaka pri različitim koncentracijama ispitivane supstance), može se poći od pretpostavke da je konstanta brzine prvog reda reprezentativna za primenjene uslove ispitivanja tj. za ispitivanu supstancu, vodeni uzorak i temperaturu. U kojoj meri se rezultati mogu generalizovati odnosno ekstrapolisati na druge sisteme oceniti stručnom procenom. Ako se koristi visoka koncentracija ispitivane supstance i razgradnja stoga ne sledi kinetiku prvog reda, podaci se neće moći koristiti za direktnu procenu konstante brzine prvog reda odnosno odgovarajućeg vremena poluraspada. Međutim, podaci dobijeni u ispitivanju sa visokom koncentracijom ispitivane supstance mogu se iskoristiti za procenu stepena ukupne mineralizacije i/ili utvrđivanje i kvantifikaciju proizvoda transformacije.

Ako su poznati gubici u procesima različitim od biorazgradnje (npr. hidroliza ili isparavanje), oni se mogu oduzeti od neto gubitaka utvrđenih tokom ispitivanja kako bi se dobila približna procena biorazgradnje. Podaci o hidrolizi mogu se dobiti npr. pomoću sterilne kontrole ili iz paralelnog ispitivanja sa višom koncentracijom ispitivane supstance.

Indirektno i direktno određivanje 14CO2 (videti odeljak 1.8.9.4. i Dodatak treći ove metode) može se koristiti samo za merenje stepena mineralizacije ispitivane supstance u CO2. Radiohromatografija (RAD-TLC) i HPLC mogu se koristiti za analizu koncentracija 14C obeležene ispitivane supstance i formiranja glavnih proizvoda transformacije (videti odeljak 1.8.9.4. ove metode). Direktna procena vremena poluživota moguća je samo ako nisu prisutni glavni proizvodi transformacije (definisani kao ≥ 10% primenjene količine ispitivane supstance). Ako su prisutni glavni proizvodi transformacije u smislu ove definicije, potrebno je detaljno vrednovanje podataka. Ovo može podrazumevati ponovljeno ispitivanje i/ili utvrđivanje proizvoda transformacije (videti odeljak 1.8.9.5. ove metode), osim ako se sudbina proizvoda transformacije može prilično dobro odrediti na osnovu iskustva (npr. informacije o putanji razgradnje). Budući da udeo ugljenika iz ispitivane supstance koji prelazi u CO2 nije uvek jednak (što u velikoj meri zavisi od koncentracije ispitivane supstance i drugih raspoloživih supstrata, uslova ispitivanja i mikrobiološke zajednice), ovo ispitivanje ne omogućava direktnu procenu potpune biorazgradnje kao što je to slučaj kod ispitivanja opadanja DOC, ali je rezultat sličan onome koji se dobija respirometrijskim ispitivanjem. Stepen mineralizacije će, prema tome, biti manji ili jednak minimalnom stepenu potpune biorazgradnje. Da bi se dobila sveobuhvatnija slika potpune biorazgradnje (mineralizacija i ugradnja u biomasu), na kraju ispitivanja sprovesti analizu fazne raspodele 14C (videti Dodatak prvi ove metode). 14C u česticama sastojaće se od 14C ugrađenog u bakterijsku biomasu i 14C adsorbovanog na organske čestice.

*2.3. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Ako se referentna supstanca ne razgradi u očekivanom vremenskom periodu (za anilin i natrijum benzoat obično manje od dve nedelje), posumnjati u validnost ispitivanja i ispitivanje podvrgnuti dodatnim proverama, ili ga ponoviti sa novim vodenim uzorkom. U ISO međulaboratorijskom ispitivanju ove metode u kojem je učestvovalo sedam laboratorija iz raznih delova Evrope, prilagođene konstante brzine razgradnje za anilin kretale su se između 0,3 i 1,7 dana-1, prosečno 0,8 dana-1, pri temperaturi od 20° C uz standardnu grešku od ± 0,4 danaa-1 (t1/2 = 0,9 dana). Uobičajena vremena prilagođavanja bila su između 1 i 7 dana. Kod voda za ispitivanje zabeležena je bakterijska biomasa 103 ćelija/ml do 104 ćelija/ml (ili "colony forming units", u daljem tekstu: CFU). Brzine razgradnje u srednjeevropskim vodama koje su bogate hranljivim supstancama bile su više nego u nordijskim oligotrofnim vodama, što može biti posledica razlike u trofičkom stanju ili ranijeg izlaganja hemijskim supstancama.

Kod radioaktivno obeleženih supstanci, ukupna efikasnost (bilans mase) na kraju eksperimenta iznosi između 90% i 110%, dok kod neobeleženih supstanci početna efikasnost je između 70% i 110%. Navedene opsege shvatiti kao ciljne vrednosti i ne koristiti ih kao kriterijum za prihvatanje ispitivanja.

**3. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU**

U izveštaju o ispitivanju jasno navesti vrstu ispitivanja koje se obavlja - pelagički test ili ispitivanje sa suspendovanim sedimentom i najmanje podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci i referentnoj supstanci:

- uobičajeni nazivi, hemijski nazivi (po mogućstvu nazivi IUPAC i/ili CAS), CAS brojevi, strukturne formule (kojima se ukazuje na položaj 14C, ako se koristi radioaktivno obeležena supstanca) i relevantna fizičko-hemijska svojstva ispitivane i referentne supstance (videti odeljke 1.5. i 1.6. ove metode),

- hemijski nazivi, CAS brojevi, strukturne formule (kojima se ukazuje na položaj 14C, ako se koristi radioaktivno obeležena supstanca) i relevantna fizičko-hemijska svojstva supstanci koje se koriste kao standardi za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda transformacije,

- čistoća (nečistoće) ispitivanih i referentnih supstanci,

- radiohemijska čistoća obeležene hemikalije i specifična aktivnost (po potrebi).

2) Površinskim vodama:

Za vodeni uzorak navesti najmanje sledeće podatke:

- lokacija i opis mesta uzorkovanja uključujući, po mogućstvu, istoriju zagađenja,

- datum i vreme uzimanja uzorka,

- hranljive supstance (ukupni N, amonijum, nitrit, nitrat, ukupni R, rastvoreni ortofosfat),

- dubina uzorkovanja,

- izgled uzorka (npr. boja i mutnoća),

- DOC i TOC,

- BOD,

- temperatura i pH na mestu uzorkovanja u vreme uzorkovanja,

- kiseonik ili redoks potencijal (obavezno samo ako aerobni uslovi nisu očigledni),

- salinitet ili provodljivost (u slučaju morske i slankaste vode),

- suspendovana čvrsta supstanca (u slučaju mutnog uzorka),

- po mogućstvu i druge relevantne informacije o mestu uzorkovanja u trenutku uzorkovanja (npr. aktuelni ili istorijski podaci o brzini protoka reka ili morskih struja, značajnija ispuštanja otpadnih voda u blizini i vrsta otpadnih voda, vremenski uslovi pre uzorkovanja), i opciono:

- biomasa mikroorganizama (npr. direktno brojanje tehnikom bojenja akridin oranžom ili CFU),

- neorganski ugljenik,

- koncentracija hlorofila kao specifična procena biomase algi.

Ako se vrši ispitivanje sa suspendovanim sedimentom, navesti i sledeće podatke o sedimentu:

- dubina uzimanja sedimenta,

- izgled sedimenta (npr. obojen, muljevit, praškast, ili peskovit),

- tekstura (npr. % krupnog peska, finog peska, praha i ilovače),

- suva supstanca u g/l suspendovane čvrste supstance, koncentracija TOC ili gubitak mase nakon žarenja kao mera sadržaja organske supstance,

- pH,

- kiseonik ili redoks potencijal (obavezno samo ako aerobni uslovi nisu očigledni).

3) Uslovima ispitivanja:

- vremenski razmak između uzorkovanja i upotrebe u laboratorijskom ispitivanju, skladištenje uzorka i prethodna obrada uzorka, datumi sprovođenja ispitivanja,

- primenjena količina ispitivane supstance, ispitivana koncentracija i referentna supstanca,

- način primene ispitivane supstance, uključujući svaku upotrebu rastvarača,

- zapremina upotrebljene površinske vode i sedimenta (ako se koristi) i zapremina uzorka koji se uzima na analizu u svakom vremenu uzorkovanja,

- opis ispitnog sistema koji se koristi.

Ako se ispitivanje ne može sprovesti u mraku, informacije o uslovima "difuznog osvetljenja":

- informacije o metodi/ama koje su upotrebljene za pripremu sterilnih kontrola (npr. temperatura, vreme i broj autoklaviranja),

- temperatura inkubacije,

- informacije o analitičkim tehnikama i metodi/ama koje se koriste za radiohemijska merenja i proveru bilansa mase i merenja fazne raspodele (ako se vrše),

- broj ponavljanja.

4) Rezultatima:

- procenat iskorišćenja (videti odeljak 1.7.1. ove metode),

- ponovljivost i osetljivost primenjenih analitičkih metoda, uključujući granicu detekcije (LOD) i granicu kvantifikacije (LOQ) (videti odeljak 1.7.2. ove metode),

- prikaz svih izmerenih podataka (uključujući vremena uzorkovanja) i izračunatih vrednosti u tabelarnom obliku i krive razgradnje; za svaku ispitivanu koncentraciju i svako ponavljanje navesti koeficijent linearne korelacije za nagib logaritamskog grafika, procenjenu fazu prilagođavanja i konstantu brzine prvog reda ili pseudoprvog reda (po mogućstvu) kao i odgovarajuće vreme polurazgradnje (odnosno vreme poluživota t50),

- proseci rezultata pojedinačnih ponavljanja za odgovarajuće vrednosti, npr. dužina faze prilagođavanja, konstanta brzine razgradnje i vreme polurazgradnje (ili t50),

- kategorizovati sistem kao neprilagođeni sistem ili prilagođeni sistem u odnosu na izgled krive razgradnje i mogući uticaj ispitivane koncentracije,

- rezultati završne provere bilansa mase i rezultati merenja fazne raspodele (prema potrebi),

- udeo mineralizovanog 14C i, ako se koriste specifične analize, konačni nivo primarne razgradnje,

- identifikacija, molarna koncentracija i procenat primenjene koncentracije i glavni proizvodi transformacije (videti odeljak 1.8.9.5. ove metode) prema potrebi,

- predloženi put transformacije, prema potrebi,

- tumačenje rezultata.

**4. LITERATURA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water - Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations - Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality - Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of 14C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 - report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

**Deo drugi**

**DODATAK 1.**

Fazna raspodela 14C

Radi provere postupka, rutinska merenja aktivnosti preostalog ukupnog organskog 14C (TOA) dopuniti merenjima bilansa mase sa direktnim određivanjem dobijenog 14CO2 koji se skuplja u adsorberu (videti Dodatak treći ove metode). Potvrda formiranja 14CO2 je sama po sebi direktan dokaz biorazgradnje, za razliku od abiotičke razgradnje i drugih mehanizama gubitaka, kao što je isparavanje ili sorpcija. Dodatne informacije koje mogu biti korisne za opisivanje procesa biorazgradnje mogu se dobiti merenjem raspodele TOA između rastvorenog oblika (aktivnost rastvorenog organskog 14C, DOA) i čvrstog oblika (aktivnost čvrstog organskog 14C, POA) nakon odvajanja čestica membranskom filtracijom ili centrifugiranjem. POA se sastoji od ispitivane supstance adsorbovane na biomasu mikroorganizama i druge čestice kao i od ugljenika sadržanog u ispitivanoj supstanci koji se koristi za sintezu novog ćelijskog materijala i tako se ugrađuje u čvrstu frakciju biomase. Formiranje rastvorene organske supstance 14C može se odrediti kao DOA na kraju biorazgradnje (plato krive razgradnje u zavisnosti od vremena).

Faznu raspodelu preostalog 14C u odabranim uzorcima proceniti filtriranjem uzoraka kroz membranski filter veličine pora 0,22 μm ili 0,45 μm izrađen od materijala koji ne adsorbuje značajne količine ispitivane supstance (npr. polikarbonatni filteri). Ako je adsorpcija ispitivane supstance na filter prevelika da bi se mogla zanemariti (ovo proveriti pre eksperimenta), umesto filtriranja se može koristiti centrifugiranje pri velikoj brzini (2000 g; 10 min).

Sa filtratom odnosno supernatantom se postupa kao sa nefiltriranim uzorcima iz Dodatka 3. Membranski filteri se rastvore u odgovarajućoj tečnosti za scintilaciju i broji se na uobičajeni način, obično uz korekciju gašenja (quenching) primenom spoljnog standarda (external standard ratio method) ili se upotrebi oksidaciono sredstvo za uzorak. Ako se koristi centrifugiranje, talog formiran od čvrste frakcije se resuspenduje u 1 ml do 2 ml destilovane vode i prenese u bočicu za scintilaciju. Zatim se posuda dvaput ispere sa 1 ml destilovane vode i voda od ispiranja prenese u bočicu. Suspenzija se pre brojanja metodom tečne scintilacije može prema potrebi obložiti gelom.

**DODATAK 2.**

Polukontinuirani postupak

U slučaju postojanih supstanci ponekad je potrebno produžiti vreme inkubacije i do nekoliko meseci da bi se postigla dovoljna razgradnja. Ispitivanje po pravilu ne traje duže od 60 dana, osim ako se ispitivana suspenzija obnavlja kako bi se održala izvorna svojstva vodenog uzorka. Trajanje ispitivanja se može produžiti do najviše 90 dana i bez obnavljanja ispitivane suspenzije ako je razgradnja ispitivane supstance započela u prvih 60 dana.

Kod dugotrajnije inkubacije raznolikost mikrobiološke zajednice se može smanjiti zbog različitih mehanizama gubitaka i mogućeg iscrpljenja zaliha esencijalnih hranljivih supstanci i primarnih supstrata ugljenika u vodenom uzorku. Stoga se kod supstanci koje se sporo razgrađuju preporučuje primena polukontinuiranog postupka kako bi se pravilno odredila brzina razgradnje. Ispitivanje započeti u polukontinuiranom postupku ako se na osnovu ranijih iskustava očekuje da će za 20%-tnu razgradnju supstance biti potreban period inkubacije od tri meseca. Druga mogućnost je da se uobičajeni šaržni postupak zameni za polukontinuirani ako tokom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane supstance. Polukontinuirani postupak se može prekinuti i ispitivanje nastaviti šaržnim postupkom ukoliko se zabeleži značajna razgradnja (npr. > 20%).

Kod polukontinuiranog postupka svake dve nedelje oko jedna trećine zapremine ispitivane suspenzije zamenjuje se sveže prikupljenom vodom u koju je dodata ispitivana supstanca do početne koncentracije. Ako se koristi fakultativno ispitivanje sa suspendovanim sedimentom, zamenskoj vodi dodati i sediment u početnoj koncentraciji (između 0,01 g/l i 1 g/l). Važno je naglasiti da se u slučaju sprovođenja ispitivanja sa suspendovanim česticama sedimenta sistem održava u potpunoj suspenziji i tokom obnavljanja jer se u protivnom gubi predviđena sličnost sa homogenim vodenim sistemom bez fiksnih voda-sediment faza. Iz tih razloga, kod primene polukontinuiranog postupka poželjno je da se početna koncentracija suspendovanog sedimenta odabere iz donjeg deo datog opsega.

Ispitivana supstanca se dodaje tako da kod delimičnog obnavljanja ispitivane suspenzije ne dođe do prekoračenja početne koncentracije ispitivane supstance, kako bi se izbeglo prilagođavanje koja se često javlja pri visokim koncentracijama ispitivane supstance. Budući da postupak obuhvata i ponovnu inokulaciju i nadoknađivanje potrošenih hranljivih supstanci i primarnih supstrata, izvorna mikrobiološka raznolikost se ponovo uspostavlja i ispitivanje se teoretski može beskonačno produžavati. Kod polukontinuiranog postupka, važno je napomenuti da se preostala koncentracija ispitivane supstance koriguje u odnosu na količine ispitivane supstance koje se dodaju i uklanjaju u svakom postupku obnavljanja. Ukupna koncentracija ispitivane supstance i koncentracija rastvorene ispitivane supstance naizmenično se koriste u slučaju jedinjenja kod kojih ne dolazi do znatnije sorpcije. Sorpcija je u utvrđenim uslovima (0,1 g do 1 g čvrste supstance/l) beznačajna (< 5%) kod supstanci sa log Kow < 3 (važi za neutralna, lipofilna jedinjenja). To se može videti i na sledećem računskom primeru: 0,1 g/l čvrste supstance otprilike odgovara 10 mg ugljenika po litru (udeo ugljenika fC = 0,01).

Pod pretpostavkom da je:

Log Kow (ispitivane supstance) = 3

Koc = 0,42 × Kow

Koeficijent raspodele, Kd = c × Koc

tada je rastvorena frakcija ukupne koncentracije (C-voda (Cw)/C-ukupni (Ct):

Cw/Ct = 1/(1 + Kd × SS) = 1(1 + Koc × fC × SS) = 1/(1 + 0,42 × 103 × 0,01 × 0,1 × 10-3) = 0,999

**DODATAK 3.**

**Određivanje 14CO2**

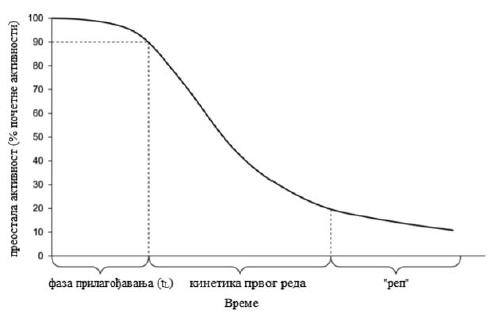
Indirektno određivanje 14CO2

Kod rutinskih merenja indirektna metoda po pravilu zahteva najmanje vremena i najpreciznija je ukoliko ispitivane supstance nisu isparljive i ne prelaze u isparljive proizvode transformacije. Nefiltrirani uzorci od npr. 5 ml se jednostavno prenesu u bočice za scintilaciju. Odgovarajuća početna aktivnost u uzorcima je 5000 dpm do 10000 dpm (80 Bq do 170 Bq), a minimalna početna aktivnost iznosi oko 1.000 dpm. CO2 se izlučuje nakon zakišeljavanja na pH 2-3 sa 1 do 2 kapi koncentrovane H3PO4 ili HCl. Izlučivanje CO2 se može sprovesti uduvavanjem mehurića vazduha oko ½ sata do 1 sata. Kao druga mogućnost, bočice se mogu snažno protresati 1 do 2 sata (npr. na tresilici sa pločom) ili se uz lakše protresanje ostave na tresilici preko noći. Efikasnost postupka odvajanja CO2 proveriti (produženjem vremena provetravanja ili trešenja). Zatim se doda tečnost za scintilaciju pogodna za brojanje vodenih uzoraka, uzorak se homogenizuje na vorteksu i odredi radioaktivnost metodom tečne scintilacije i oduzme osnovna aktivnost utvrđena u slepim probama (FB). Ako voda za ispitivanje nije jako obojena i ne sadrži visoku koncentraciju čestica, uzorci će po pravilu pokazivati ujednačeno gašenje (quenching) i biće dovoljno da se izvrše korekcije za gašenje primenom spoljnog standarda. Ako je voda za ispitivanje jako obojena, korekcija za gašenje se ponekad vrši dodavanjem unutrašnjeg standarda. Ukoliko je koncentracija čestica visoka nije uvek moguće dobiti homogeni rastvor odnosno gel, ili se mogu javiti velike razlike u gašenju među uzorcima. U tom slučaju se može primeniti metoda brojanja za ispitivani mulj koja je opisana u nastavku. Ako se koristi ispitivanje sa suspendovanim sedimentom, merenje 14CO2 se može obaviti indirektno tako što se uzme homogeni uzorak ispitivane vode/suspenzije od 10 ml i faze odvoje centrifugiranjem na odgovarajućoj brzini (npr. 15 minuta na 40.000 m/s2). Zatim se i sa vodenom fazom postupa kako je gore opisano. Aktivnost 14C u čvrstoj fazi (POA) određuje se tako što se sediment resuspenduje u maloj zapremini destilovane vode, prenese u bočice za scintilaciju i zatim doda tečnost za scintilaciju kako bi se dobio gel (za ovo su predviđene posebne tečnosti za scintilaciju). Zavisno od vrste čestica (npr. sadržaj organskog materijala u njima), uzorak se eventualno može ostaviti preko noći da se rastvori u sredstvu za rastvaranje tkiva, zatim homogenizovati na vorteksu i onda dodati tečnost za scintilaciju. Druga mogućnost je da se POA odredi sagorevanjem viška kiseonika pomoću oksidacionog sredstva. Kod brojanja uvek uključiti interne standarde, a korekcije za gašenje ponekad napraviti dodavanjem unutrašnjeg standarda u svaki pojedinačni uzorak.

Direktno određivanje 14CO2

Ako se nastali 14CO2 meri direktno na početku ispitivanja pripremiti više sudova za ispitivanje i u svakoj mernoj tački uzimati čitav sadržaj uzorka, zakiseliti na pH 2 do 3 i skupljati 14CO2 u unutrašnjem adsorberu (koji se stavlja u svaki ispitivani uzorak na početku ispitivanja) ili spoljnom adsorberu. Kao adsorpciono sredstvo može se koristiti alkalna supstanca (npr. rastvor 1 N NaOH ili čvrsti NaOH), etanolamin ili adsorberi na bazi etanolamina koji su dostupni na tržištu. Kod direktnog merenja 14CO2 sudovi su zatvoreni npr. zatvaračima od butilne gume.

Slika 1a. Primer aritmetičkog prikaza podataka (preostala aktivnost u zavisnosti od vremena)



Slika 1b. Primer polulogaritamskog prikaza podataka (In preostale aktivnosti u zavisnosti od vremena)



**C.26. ISPITIVANJE INHIBICIJE RASTA *LEMNA SP.***

**Deo prvi**

**1. METODA ISPITIVANJA**

Ova metoda zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD 221 (2006)**1**. Među telima EU postoji opšta saglasnost da je u slučaju jako obojenih supstanci ispitivanje na *Lemna sp.* odgovarajuća alternativa ispitivanju na algama**2,3**.

*1.1. UVOD*

Ova metoda ispitivanja je osmišljena za procenu toksičnosti supstance po slatkovodne biljke roda *Lemna* (sočivica). Ona se zasniva na postojećim smernicama**4,5,6,7,8,9**, ali uključuje neke izmene tih metoda u svetlu poslednjih istraživanja i savetovanja o nizu ključnih pitanja. Predložena metoda je validirana međunarodnim međulaboratorijskim ispitivanjem ("ring-test")**10**.

U ovoj metodi ispitivanja opisana su ispitivanja toksičnosti na vrstama *Lemna gibba* i *Lemna minor*, koje su podrobno proučene i predmet su gore navedenih standarda. Taksonomija *Lemna spp.* je složena zbog velikoga broja različitih fenotipova. Iako se u odgovoru na toksično dejstvo kod vrsta *Lemna* može javiti genetička varijabilnost, trenutno nema dovoljno podataka o tom izvoru varijabilnosti da bi se mogao preporučiti neki određeni klon za ovu metodu ispitivanja. Treba zapaziti da se ispitivanje ne izvodi aksenično, ali se u pojedinim fazama postupka ispitivanja preduzimaju koraci kako bi se zagađenje drugim organizmima svelo na najmanju moguću meru.

Dati su detalji ispitivanja sa obnavljanjem (polustatičko i protočno) i bez obnavljanja (statičko) rastvora za ispitivanje. Zavisno od ciljeva ispitivanja i regulatornih zahteva, preporučuje se da se ispita mogućnost primene polustatičkih i protočnih metoda (npr. kod supstanci koje se brzo nestaju iz rastvora usled isparavanja, fotohemijske razgradnje, taloženja ili biorazgradnje). Dodatne smernice date su u literaturi**11**.

*1.2. DEFINICIJE*

Pojedini izrazi upotrebljeni u ovoj metodi ispitivanja imaju sledeće značenje:

Biomasa jeste suva masa žive materije u populaciji. U ovoj metodi se po pravilu mere alternativni parametri biomase, kao što je broj frondova i površina frondova, pa se izraz biomasa odnosi i na te alternativne mere.

Hloroza jeste žutilo lisnog tkiva.

Klon jeste organizam ili ćelija nastala od pojedinačne jedinke putem bespolnog razmnožavanja. Prema tome, jedinke koje potiču od istog klona su genetski istovetne.

Kolonija označava združene roditeljske i potomačke frondove (obično 2 do 4) koji su međusobno spojeni. Ponekad se naziva i biljkom.

ECx jeste koncentracija ispitivane supstance rastvorene u podlozi za ispitivanje koja dovodi do x%-tnog (npr. 50%) smanjenja rasta *Lemna* u okviru navedenog perioda izlaganja (koje izričito navesti ako odstupa od punog ili uobičajenog trajanja ispitivanja). Da bi se nedvosmisleno pokazalo da li je vrednost EC dobijena iz brzine rasta ili iz prirasta koristi se simbol "ErC" za brzinu rasta (growth rate) i "EyC" za prirast (yield), iza čega se navodi merna promenljiva npr. ErC (broj frondova).

Protočno ispitivanje jeste ispitivanje u kom se ispitivani rastvori stalno zamenjuju.

Frond jeste zasebna/pojedinačna listolika struktura biljke sočivice. Najmanja je reproduktivno sposobna jedinica odnosno jedinka.

Nabreklina označava frondove grbavog ili nabreknutog izgleda.

Rast jeste povećanje merne promenljive, npr broj frondova, suva masa, vlažna masa ili površina frondova, u periodu ispitivanja.

Brzina rasta (prosečna specifična brzina rasta) jeste logaritamsko povećanje biomase u periodu izlaganja.

Najniža koncentracija sa zapaženim efektom (u daljem tekstu: LOEC) jeste najniža ispitana koncentracija pri kojoj je tokom određenog perioda izlaganja zapaženo da supstanci statistički značajan efekat usporavanja rasta (pri p < 0,05) u poređenju sa kontrolom. Međutim, sve ispitivane koncentracije iznad LOEC potrebno je da imaju jednak ili veći štetan efekat od onoga koji je zabeležen pri LOEC. Ako se ova dva uslova ne mogu ispuniti, detaljno objasniti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).

Merne promenljive jesu sve vrste promenljivih veličina koje se mere kako bi se izrazio praćeni parametar ispitivanja primenom jedne ili više promenljivih odgovora. Kod ove metode merne promenljive su broj frondova, površina frondova, sveža masa i suva masa.

Monokultura jeste kultura koja sadrži jednu biljnu vrstu.

Nekroza jeste mrtvo (tj. belo ili vodom natopljeno) tkivo fronda.

Najviša koncentracija bez zapaženog efekta (u daljem tekstu: NOEC) jeste ispitivana koncentracija neposredno ispod LOEC.

Fenotip jesu vidljive karakteristike organizma određene interakcijom njegovih gena i životne sredine.

Promenljive odgovora jesu promenljive veličine za procenu toksičnosti izvedene iz bilo koje merene promenljive koja opisuje biomasu primenom različitih metoda izračunavanja. Kod ove metode brzine rasta i prirasta jesu promenljive odgovora izvedene iz mernih promenljivih kao što su broj frondova, površina frondova, sveža masa ili suva masa.

Polustatičko ispitivanje (ispitivanje sa obnavljanjem) jeste ispitivanje gde se ispitivani rastvor zamenjuje periodično, u određenim razmacima, tokom ispitivanja.

Statičko ispitivanje jeste metoda ispitivanja gde se ispitivani rastvor ne obnavlja tokom ispitivanja.

Praćeni parametar ispitivanja opisuje opšti faktor koji će se menjati usled dejstva ispitivane hemikalije u odnosu na kontrolu kao cilj ispitivanja. Kod ove metode praćeni parametar ispitivanja je inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim promenljivim odgovora koje se zasnivaju na jednoj ili više mernih promenljivih.

Podloga za ispitivanje jeste celokupna sintetička hranljiva podloga na kojoj ispitivane biljke rastu kad se izlože ispitivanoj supstanci. Ispitivana supstanca će se obično rastvoriti u podlozi za ispitivanje.

Prirast jeste vrednost merne promenljive kojom se izražava razlika između biomase na kraju perioda izlaganja i merne promenljive na početku perioda izlaganja.

*1.3. PRINCIP ISPITIVANJA*

Eksponencijalno rastuće biljne kulture roda *Lemna* puste se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama ispitivane materije u periodu od sedam dana. Cilj ispitivanja je da se kvantifikuju efekti supstance na vegetativni rast tokom ovog perioda na osnovu procene odabranih mernih promenljivih. Broj frondova je primarna merna promenljiva. Osim toga, meri se najmanje još jedna merna promenljiva (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa), budući da neke supstance znatno više utiču na neke druge merne promenljive nego na broj frondova. Da bi se kvantifikovali efekti supstance, rast u ispitivanim rastvorima se upoređuje sa rastom u kontrolama i određuje se koncentracija koja izaziva određeni procenat (x%) inhibicije rasta (npr. 50%), koja se izražava kao ECx (npr. EC50).

Praćeni parametar ispitivanja je inhibicija rasta, koji se izražava kao logaritamsko povećanje merne promenljive (prosečna specifična brzina rasta) u periodu izlaganja. Iz prosečnih specifičnih brzina rasta zabeleženih u seriji ispitivanih rastvora određuje se koncentracija koja izaziva određeno x%-tno smanjenje brzine rasta (npr. 50%), koja se izražava kao ErCx (npr. ErC50).

U ovoj metodi ispitivanja koristi se i dodatna promenljiva odgovora, prirast, koja je potrebna da bi se ispunili posebni regulatorni zahtevi u nekim državama. On se definiše kao razlika između mernih varijabli na kraju perioda izlaganja i mernih varijabli na početku perioda izlaganja. Iz prirasta zabeleženog u seriji ispitivanih rastvora izračunava se koncentracija koja izaziva određeno x%-tno smanjenje prirasta (npr. 50%), koja se izražava kao EyCx (npr. EyC50).

Osim toga, može se statistički odrediti najniža koncentracija sa zapaženim efektom (LOEC) i najviša koncentracija bez zapaženog efekta (NOEC).

*1.4. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI*

Analitička metoda odgovarajuće osetljivosti za kvanitifikaciju supstance u podlozi za ispitivanje potrebno je da bude na raspolaganju.

Informacije o ispitivanoj supstanci koje mogu biti korisne pri uspostavljanju uslova ispitivanja su: strukturna formula, čistoća, rastvorljivost u vodi, stabilnost u vodi i fotostabilnost, pKa, Kow, napon pare i biorazgradljivost. Rastvorljivost u vodi i napon pare mogu se upotrebiti za izračunavanje konstante Henrijevog zakona, iz koje se može zaključiti da li u periodu ispitivanja očekivati značajne gubitke ispitivane supstance. To će pomoći da se utvrdi da li je potrebno preduzeti određene mere da se takvi gubici kontrolišu. Ako su podaci o rastvorljivosti i stabilnosti ispitivane supstance nesigurne, preporučuje se da se rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance procenjuje u uslovima ispitivanja tj. hranljiva podloga, temperatura, režim osvetljenja koji će se koristiti u toku ispitivanja.

U slučajevima kada je kontrolisanje pH vrednosti podloge za ispitivanje naročito važno, npr. kod ispitivanja metala ili supstanci koje su hidrolitički nestabilne, preporučuje se da se u hranljivu podlogu doda pufer (videti odeljak 1.7.4. ove metode). Dodatne smernice za ispitivanje supstance čija fizičko-hemijska svojstva otežavaju ispitivanje date su u literaturi**11**.

*1.5. REFERENTNA SUPSTANCA*

Jedna ili više referentnih supstanci kao npr. 3,5-dihlorfenol korišćen u međunarodnom međulaboratorijskom ispitivanju**10**, mogu se ispitati za proveru postupka ispitivanja. Preporučljivo je da se referentna supstanca ispita najmanje dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje sprovodi ređe, istovremeno sa određivanjem toksičnosti ispitivane supstance.

*1.6. VALIDNOST ISPITIVANJA*

Da bi ispitivanje bilo validno, vreme potrebno da se broj frondova u kontrolnom uzorku udvostruči je kraće od 2,5 dana (60 sati), što približno odgovara sedmorostrukom povećanju za sedam dana i prosečnoj specifičnoj brzini rasta od 0,275 d-1. Uz podloge i uslove ispitivanja opisane u ovoj metodi ispitivanja ovaj kriterijum se može zadovoljiti primenom statičkog režima ispitivanja**8**. Takođe se očekuje da će ovaj kriterijum moći da se ispuni u polustatičkim i protočnim uslovima ispitivanja. Izračunavanje vremena udvostručenja prikazano je u odeljku 2.1. ove metode.

*1.7. OPIS METODE*

**1.7.1. Aparatura**

Sva oprema koja dolazi u dodir sa podlogama za ispitivanje je izrađena od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Staklena oprema koja se koristi za gajenje i ispitivanje je sterilna i očišćena od hemijskih zagađivača koji bi mogli dospeti u podlogu za ispitivanje. Sudovi za ispitivanje su dovoljno široki da frondovi različitih kolonija u sudovima sa kontrolom mogu rasti tako da na kraju ispitivanja ne dođe do njihovog preklapanja. Ne smeta ako korenje dodiruje dno suda za ispitivanje, ali preporučuje se da sve sudovi za ispitivanje imaju dubinu od najmanje 20 mm i zapreminu od najmanje 100 ml. Izbor suda za ispitivanje nije bitan sve dok su ovi zahtevi ispunjeni. Staklene čaše, sudovi za kristalizaciju i staklene petri šolje odgovarajućih dimenzija su se pokazali kao podesni. Sudove za ispitivanje prekriti kako bi se smanjilo isparavanje i slučajno zagađenje, ali pritom omogućiti nužan protok vazduha. Odgovarajući sudovi za ispitivanje, a naročito poklopci, ne smeju stvarati senku niti izazivati promene u karakteristikama spektra svetlosti.

Kulture i sudovi za ispitivanje se ne drže zajedno. To je najlakše postići ako se koriste odvojene komore za gajenje, inkubatori, odnosno prostorije. Osvetljenje i temperaturu kontrolisati i održavati na stalnom nivou (videti odeljak 1.7.8. ove metode).

**1.7.2. Ispitivani organizam**

Organizam koji se koristi za potrebe ovog ispitivanja je Lemna gibba ili *Lemna minor*. Kratak opis vrsta sočivice koje se koriste u ispitivanjima toksičnosti dat je u Dodatku 1. ove metode. Biljni materijal se može nabaviti u zbirkama kultura, iz druge laboratorije ili prikupiti na terenu. Ako se materijal prikuplja na terenu, biljke držati u kulturi na istoj podlozi kakva će se koristiti u ispitivanju, najmanje osam nedelja pre upotrebe. Mesta na kojima se prikupljaju polazne kulture ne smeju biti kontaminirana očiglednim izvorima zagađenja. Ako se kulture nabavljaju iz druge laboratorije ili iz zbirke kultura, držati ih u sličnim uslovima najmanje tri nedelje. Izvor biljnog materijala i vrstu i klon (ako je poznat) koji se koriste kod ispitivanja svaki put dokumentovati.

Treba koristiti monokulture kod kojih nisu prisutna vidljiva zagađenja drugim organizmima kao što su alge i protozoe. Zdrave biljke *L. minor* sastoje se od kolonija koje sadrže između dva i pet frondova, dok zdrave kolonije *L. gibba* mogu da imaju i do sedam frondova.

Kvalitet i jednolikost biljaka koje se koriste u ispitivanju imaju značajan uticaj na rezultate ispitivanja pa biljke pažljivo odabrati. Koristiti mlade, brzo rastuće biljke bez vidljivih oštećenja i promena boje (hloroza). Svojstvo kvalitetnih kultura je visok udeo kolonija koje sadrže najmanje dva lista. Veliki broj kolonija sa pojedinačnim frondom ukazuje na sredinski stres (npr. ograničena količina hranljivih materija) pa biljni materijal iz takvih kultura ne koristiti kod ispitivanja.

**1.7.3. Gajenje kulture**

Da bi se smanjili zahtevi održavanja kulture (npr. kad određeno vreme nisu planirana ispitivanja sa sočivicom), kulture se mogu držati pod smanjenim osvetljenjem i na nižoj temperaturi (4° C do 10° C). Informacije o uzgajanju date su u Dodatku 2. ove metode. U slučaju očiglednih znakova zagađenja algama i drugim organizmima, poduzorak frondova *Lemna* podvrgnuti površinskoj sterilizaciji i preneti ga u svežu podlogu (videti Dodatak drugi ove metode). U ovom slučaju ostatak zagađene kulture baciti.

Najmanje sedam dana pre ispitivanja dovoljan broj kolonija aseptički preneti u svežu sterilnu podlogu i uzgajati 7 do 10 dana u uslovima ispitivanja.

**1.7.4. Podloga za ispitivanje**

Za vrste *Lemna minor* i *Lemna gibba* preporučuju se različite podloge, kako je opisano u daljem tekstu. Ako se sumnja da bi pH pufer u podlozi za ispitivanje (MOPS (4-morfolinpropan-sulfonska kiselina, CAS br. 1132-61-2, EINECS br. 214-478-5) za podlogu *L. minor* i NaHCO3 za podlogu *L.gibba*) mogao da reaguje sa ispitivanom supstancom i tako utiče na ekspresiju njene toksičnosti, razmisliti pre nego što se pufer doda u podlogu za ispitivanje. Prihvatljiva je i podloga Štajnberg**12** pod uslovom da su zadovoljeni kriterijumi validnosti.

Za gajenje kulture i ispitivanje sa *L. minor* preporučuje se izmenjena varijanta hranljive podloge Lemna prema švedskom standardu (SIS). Sastav ove podloge naveden je u Dodatku 3. ove metode.

Hranljiva podloga 20X - AAP, opisana u Dodatku 3. ove metode, preporučuje se za uzgajanje kulture i ispitivanja sa *L.gibba*.

Podloga Štajnberg koja je opisana u Dodatku 3. pogodna je i za *L. minor*, ali se može koristiti i za *L.gibba* pod uslovom da su zadovoljeni kriterijumi validnosti.

**1.7.5. Rastvori za ispitivanje**

Rastvori za ispitivanje obično se pripremaju razređivanjem radnog rastvora. Radni rastvori ispitivane supstance se obično pripremaju rastvaranjem supstance u hranljivoj podlozi.

Najviša ispitivana koncentracija ispitivane supstance po pravilu ne sme da premaši rastvorljivost supstance u vodi u uslovima ispitivanja. Treba napomenuti da *Lemna spp.* pluta na površini i da može biti izložena supstancama koja se skupljaju u međuprostoru voda - vazduh (npr. supstance koje su slabo rastvorljive u vodi, hidrofobne supstance, površinski aktivne supstance). Pod takvim okolnostima izlaganje proizilazi od supstance koja se nalazi izvan rastvora i ispitivane koncentracije mogu, zavisno od svojstava ispitivane supstance, premašivati rastvorljivost u vodi. Kod ispitivanih supstanci niske rastvorljivosti u vodi ponekad je potrebno pripremiti koncentrovani radni rastvor ili disperziju supstanci koristeći organski rastvarač ili sredstvo za dispergovanje, kako bi se olakšalo dodavanje tačnih količina ispitivane supstance u podlogu za ispitivanje i pospešilo njeno dispergovanje i rastvaranje. Treba nastojati da se izbegne korišćenje takvih materijala kad god je to moguće. Upotrebljeni pomoćni rastvarači odnosno sredstva za dispergovanje ne bi smeli da imaju fitotoksično dejstvo. Na primer, u obično korišćene rastvarače u širokoj upotrebi koji nemaju fitotoksično dejstvo u koncentracijama do 100 μl·l-1 obuhvataju aceton i dimetilformamid. Ako se koristi rastvarač ili sredstvo za dispergovanje, navesti njegovu konačnu koncentraciju i održavati je na minimumu (≤ 100 μl·l-1), a sve obrade i kontrole potrebno je da sadrže istu koncentraciju rastvarača odnosno sredstva za dispergovanje. Dodatne smernice o upotrebi dispergenata navedene su u literaturi**11**.

**1.7.6. Ispitivane i kontrolne grupe**

Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane supstance po sočivici, npr. na osnovu ispitivanja za određivanje opsega, mogu pomoći u izboru odgovarajućih ispitivanih koncentracija. Kod konačnog ispitivanja toksičnosti obično je potrebno najmanje pet ispitivanih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu. Ispitivane koncentracije se po mogućstvu ne bi smele razlikovati za faktor viši od 3,2, ali može se koristiti i viša vrednost ako je kriva koncentracija-odgovor ravna. Ako se koristi manje od pet koncentracija, dati obrazloženje. Za svaku ispitivanu koncentraciju potrebno je najmanje tri ponavljanja.

Kod određivanja opsega ispitivanih koncentracija (za određivanje opsega i/ili konačno ispitivanje toksičnosti) uzeti u obzir sledeće:

- Da bi se kod određivanja ECx obezbedio potreban nivo pouzdanosti, vrednost ECx se nalazi između najviše i najniže ispitivane koncentracije. Na primer, ako se procenjuje EC50, najviša ispitivana koncentracija je viša od EC50. Ako se vrednost EC50 nalazi izvan opsega ispitivanih koncentracija, pripadajući intervali poverenja biće veliki i možda neće biti moguće ispravno oceniti statističku podesnost modela.

- Ako je cilj da se proceni LOEC/NOEC, najniža ispitivana koncentracija je dovoljno niska da rast ne bude značajno niži od rasta u kontrolnoj grupi. Isto tako, najviša ispitivana koncentracija je potrebno da bude dovoljno visoka da rast bude značajno niži nego u kontrolnoj grupi. Ako to nije slučaj, ispitivanje ponoviti s drugim rasponom koncentracija (osim ako je najviša koncentracija na granici rastvorljivost ili je jednaka maksimalnoj potrebnoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg·l-1).

Svako ispitivanje obuhvata kontrole sa istom hranljivom podlogom, istim brojem frondova i kolonija, sredinskim uslovima i postupcima kao kod sudova za ispitivanje, ali bez ispitivane supstance. Ako se koristi pomoćni rastvarač ili sredstvo za dispergovanje, potrebna je dodatna kontrola koja sadrži istu koncentraciju rastvarača/sredstva za dispergovanje kao sudovi sa ispitivanom supstancom. Broj sudova sa kontrolnim ponavljanjima (i sudova sa rastvaračem, ako se koristi) je najmanje jednak broju sudova koji se koriste za svaku ispitivanu koncentraciju, a po mogućstvu i dvostruko veći.

Ako nije potrebno da se odredi NOEC, postavka ispitivanja se može izmeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Broj kontrolnih ponavljanja je najmanje tri.

**1.7.7. Izlaganje**

Kolonije koje se sastoje od 2 do 4 vidljiva fronda prenesu se iz kulture inokuluma i nasumično raspodele po sudovima za ispitivanje pod aseptičnim uslovima. Svaki sud za ispitivanje sadrži ukupno 9 do 12 frondova. Broj frondova i kolonija je jednak u svim sudovima za ispitivanje. Iskustva sa ovim metodom i podaci iz međulaboratorijskog ispitivanja pokazuju da je dovoljno koristiti tri ponavljanja po obradi, od kojih svako u početku sadrži 9 do 12 frondova, da se između obrada utvrde razlike u rastu na nivou inhibicije od oko 4% do 7%, izračunato na osnovu brzine rasta (10% do 15% izračunato na osnovu prirasta)**10**.

Sudove za ispitivanje nasumično rasporediti po inkubatoru kako bi se smanjio uticaj prostornih razlika u intenzitetu osvetljenja ili temperaturi. Osim toga, prilikom opažanja primeniti blok sistem ili slučajno razmeštanje sudova (ili češće razmeštanje).

Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti pokaže da se koncentracija ispitivane supstance ne može održati (tj. izmerena koncentracija padne ispod 80% izmerene početne koncentracije) u toku perioda ispitivanja (7 dana), preporučuje se polustatički režim ispitivanja. U tom slučaju kolonije izložiti sveže pripremljenim ispitivanim i kontrolnim rastvorima najmanje dvaput tokom ispitivanja (npr 3. dan i 5. dan). Učestalost izlaganja svežoj podlozi zavisiće od stabilnosti ispitivane supstance; u slučaju jako nestabilnih i isparljivih supstanci potrebno je češće izlaganje svežoj podlozi da bi se održale približno stalne koncentracije. U određenim okolnostima može biti potrebna primena protočnog postupka**11,13**.

Ova metoda ispitivanja ne obuhvata scenario izlaganja kod folijarne primene (sprej), umesto toga videti literaturu**14**.

**1.7.8. Uslovi inkubacije**

Potrebno je koristiti neprekidno toplo ili hladno belo fluorescentno osvetljenje čiji intenzitet odabrati u rasponu od 85 μE·m-2·s-1 do 135 μE·m-2·s-1, mereno u oblasti fotosintetički aktivnog zračenja (400 nm do 700 nm) u tačkama koje su jednako udaljene od izvora svetla i frondova sočivice (što odgovara 6.500 lux do 10.000 lux). Odstupanja od odabranog intenziteta svetla u ispitivanom prostoru ne smeju biti viša od ± 15%. Na izmerenu vrednost uticaće metod detekcije i merenja svetla, naročito vrsta senzora. Sferičnim senzorima (koji reaguju na svetlo iz svih uglova iznad i ispod merne ravni) i kosinusnim senzorima (koji reaguju na svetlo iz svih uglova iznad merne ravni) daje se prednost u odnosu na usmerene senzore jer daju viša očitavanja kod izvora svetlosti iz više tačaka kakav je ovde opisan.

Temperatura u sudovima za ispitivanje je 24° C ± 2° C. pH vrednost kontrolne podloge se tokom ispitivanja ne sme povećati za više od 1,5 jedinica. Odstupanje za više od 1,5 jedinica ne dovodi u pitanje validnost ispitivanja ako se može dokazati da su zadovoljeni kriterijumi validnosti. Pomak pH vrednosti ipak u nekim posebnim slučajevima zahteva dodatan oprez npr. kad se ispituju nestabilne supstance i metali.

**1.7.9. Trajanje**

Ispitivanje se prekida 7 dana nakon što se biljke prenesu u sudove za ispitivanje.

**1.7.10. Merenja i analitička određivanja**

Na početku ispitivanja izbroje se listovi u svim sudovima za ispitivanje i zabeleži broj frondova, vodeći računa da se uzmu u obzir svi istureni, jasno vidljivi frondovi. Broj frondova normalnog i promenjenog izgleda odrediti na početku ispitivanja, najmanje jednom svaka 3 dana tokom perioda izlaganja (tj. najmanje 2 puta u periodu od 7 dana) i po završetku ispitivanja. Treba zabeležiti sve promene u razvoju biljaka npr. veličina frondova, izgled, naznake nekroze, hloroze ili nabrekline, raspadanje kolonija, gubitak sposobnosti plivanja kao i promene dužine i izgleda korenja. Takođe zabeležiti značajna svojstva podloge koja se koristi tokom ispitivanja (npr. prisutnost nerastvorenog materijala, rast algi u sudu za ispitivanje).

Osim određivanja broja frondova tokom ispitivanja, potrebno je oceniti efekte ispitivane supstance na jednu (ili više) sledećih mernih promenljivih:

1) ukupna površina frondova;

2) suva masa;

3) sveža masa.

Određivanje ukupne površine frondova ima prednost zato što se može odrediti u svakom ispitivanom i kontrolnom sudu na početku, za vreme i na kraju ispitivanja. Suva odnosno sveža masa određuje se na početku ispitivanja - na uzorku kulture inokuluma koja je reprezentativna za materijal koji se koristi na početku ispitivanja, i na kraju ispitivanja - na biljnom materijalu iz svakog ispitivanog i kontrolnog suda. Ako se ne meri površina frondova, suvoj masi se daje prednost u odnosu na svežu masu.

Ukupna površina frondova, suva masa i sveža masa mogu se odrediti na sledeći način:

1) Ukupna površina frondova: Ukupna površina frondova svih kolonija može se odrediti analizom slike. Obris suda za ispitivanje i biljaka snimi se video-kamerom (npr. posuda se položi na rasvetnu kutiju) i dobijena slika se digitalizuje. Ukupna površina frondova u posudi za ispitivanje može se zatim odrediti kalibracijom sa ravnim oblicima poznate površine. Pri tom voditi računa da se isključi uticaj ivice suda za ispitivanje. Drugi, nešto zamorniji postupak je da se sud za ispitivanje i biljke fotokopiraju, dobijeni obris kolonija iseče i odredi površina uz pomoć analizatora površine frondova ili milimetarskog papira. Mogu biti pogodne i druge tehnike (npr. odnos papirne mase između površine obrisa kolonija i jedinične površine).

2) Suva masa: Izvade se sve kolonije iz sudova za ispitivanje i isperu destilovanom ili dejonizovanom vodom. Višak vode se upije papirom i kolonije suše na 60° C dok se ne postigne stalna masa. Treba uključiti sve ostatke korenja. Suvu masu izraziti sa tačnošću od najmanje 0,1 mg.

3) Sveža masa: Sve kolonije se prenesu u prethodno izvagane polistirenske epruvete (ili epruvete od drugog inertnog materijala) koje u zaobljenom dnu imaju sitne rupice (1 mm). Epruvete se zatim 10 minuta centrifugiraju na 3.000 o/min pri sobnoj temperaturi. Epruvete, koje sada sadrže osušene kolonije, ponovo se izmere i izračuna se sveža masa oduzimanjem mase prazne epruvete.

*1.7.10.1. Učestalost merenja i analitičkih određivanja*

Ako se primenjuje statički postupak, pH vrednost se meri u svakoj obradi na početku i na kraju ispitivanja. Ukoliko se koristi polustatički postupak pH izmeriti u svakoj šarži svežeg ispitivanog rastvora pre svakog obnavljanja kao i u odgovarajućim potrošenim rastvorima.

Intenzitet svetla meri se u komori za uzgajanje, inkubatoru odnosno prostoriji u tačkama koje su jednako udaljene od izvora svetla i frondova sočivice. Merenja se vrše najmanje jednom tokom ispitivanja. Osim toga, najmanje jednom dnevno beležiti temperaturu podloge u jednom zamenskom ("surogat") sudu koji se drži u istim uslovima u komori za uzgajanje, inkubatoru odnosno prostoriji.

Tokom ispitivanja, koncentracije ispitivane supstance određuju se u odgovarajućim intervalima. Kod statičkog ispitivanja koncentracije odrediti najmanje na početku i na kraju ispitivanja.

Ako se u slučaju polustatičkog ispitivanja pretpostavlja da koncentracija ispitivane supstance neće ostati u granicama ± 20% nominalne koncentracije, potrebno je analizirati sve sveže pripremljene ispitivane rastvore i zatim ponoviti analizu kod svakog obnavljanja (videti odeljak 1.7.7. ove metode). Kod ispitivanja gde izmerena početna koncentracija ispitivane supstance nije u granicama ± 20% nominalne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. u rasponu 80% do 120% početne koncentracije), hemijska određivanja se mogu sprovoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitivanoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje koncentracija ispitivane supstance pre obnavljanja obaviti samo na jednom sudu za svaku ispitivanu koncentraciju (ili na sastavljenom sadržaju posuda ponavljanja).

Ako se primenjuje protočni postupak, koristi se sličan režim uzorkovanja kao što je onaj koji je opisan za polustatička ispitivanja, uključujući analizu na početku, u sredini i na kraju ispitivanja, s tim da ovde nema merenja istrošenog rastvora. Kod ovakvih ispitivanja svakodnevno proveravati brzinu protoka vode za razređivanje i ispitivane supstance, odnosno radnog rastvora ispitivane supstance.

Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane supstance tokom ukupnog trajanja ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20% nominalne ili izmerene početne koncentracije, analiza rezultata se može zasnivati na nominalnim ili izmerenim početnim vrednostima. Ako je odstupanje od nominalne odnosno izmerene početne koncentracije veće od ± 20%, analiza rezultata zasniva se na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tokom izlaganja ili modelima koji opisuju opadanje koncentracije ispitivane supstance**11**.

**1.7.11. Granično ispitivanje**

U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana supstanca nema toksično dejstvo u koncentracijama do 100 mg·l-1 ili do njene granice rastvorljivosti u podlozi za ispitivanje (zavisno od toga šta je manje), moguće je obaviti granično ispitivanje kako bi se odgovor ispitivane grupe (100 mg·l-1 ili koncentracija jednaka granici rastvorljivosti) uporedio sa kontrolnom grupom. Preporučuje se da se uz granično ispitivanje svakako izvrši analiza koncentracije izlaganja. Za granično ispitivanje važe svi pomenuti uslovi ispitivanja i kriterijumi validnosti, s tim da broj ponavljanja u ispitivanoj grupi udvostručiti. Rast u kontrolnoj i ispitivanoj grupi može se analizirati statističkim testom za poređenje srednjih vrednosti, npr. Studentov t-test.

**2. PODACI I IZVEŠTAVANJE**

*2.1. VREME UDVOSTRUČENJA*

Da bi se odredilo vreme koje je potrebno da se broj frondova udvostruči (Td) i utvrdilo da li istraživanje ispunjava ovaj kriterijum validnosti (videti odeljak 1.6. ove metode), sa podacima dobijenim iz sudova sa kontrolom koristi se formula:

Td = *ln* 2/*μ*

gde je prosečna specifična brzina rasta m određena na način kako je opisano u odeljku 2.2.1 ove metode.

*2.2. PROMENLJIVE VELIČINE ODGOVORA*

Svrha ispitivanja je da se utvrde efekti ispitivane supstance na vegetativni rast sočivice. U ovoj metodi ispitivanja opisane su dve promenljive veličine odgovora, budući da države članice imaju različite povlastice i regulatorne zahteve. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim državama članicama, efekte procenjivati primenom obe promenljive veličine odgovora i to:

a) Prosečne specifične brzine rasta. Ova promenljiva veličina odgovora izračunava se na osnovu promena logaritama broja frondova i, osim toga, na osnovu promena logaritama nekog drugog mernog parametra (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa) u vremenu (izraženo po danu) u kontrolama i svim ispitivanim grupama. Ona se ponekad naziva i relativna brzina rasta**15**.

b) Prirasta. Ova promenljiva veličina odgovora izračunava se na osnovu promena broja frondova i, osim toga, na osnovu promena nekog drugog mernog parametra (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa) u kontrolama i svim ispitivanim grupama do kraja ispitivanja.

Treba napomenuti da vrednosti toksičnosti izračunate primenom te dve promenljive veličine odgovora nisu uporedive i tu razliku uzeti u obzir kod korišćenja rezultata ispitivanja. Ako su poštovani uslovi ispitivanja ove metode, vrednosti ECx koje se zasnivaju na prosečnoj specifičnoj brzini rasta (ErCx) uglavnom će biti više od rezultata na zasnovanih na prirastu (EyCx) zbog razlike u matematičkoj osnovi ta dva pristupa. To ne tumačiti kao razliku u osetljivosti dve promenljive veličine odgovora, već prosto prihvatiti da su te vrednosti matematički različite. Pojam prosečne specifične brzine rasta zasniva se na opštem obrascu eksponencijalnog rasta sočivice u neograničenim kulturama, gde se toksičnost procenjuje na osnovu efekata na brzinu rasta nezavisno od apsolutne vrednosti specifične brzine rasta u kontrolnoj grupi, nagiba krive koncentracija-odgovor ili trajanja ispitivanja. Za razliku od toga, rezultati koji se zasnivaju na promenljivoj veličini odgovora "prirast" zavise od svih tih drugih promenljivih veličina. EyCx zavisi od specifične brzine rasta vrsta sočivice koje se koriste u svakom ispitivanju i od maksimalne specifične brzine rasta koja se može razlikovati između vrsta sočivice, pa čak i između klonova. Ovu promenljivu odgovora ne koristiti za upoređivanje osetljivosti na otrove među vrstama sočivice, pa čak ni među različitim klonovima. Iako se, sa naučne tačke gledišta, proceni toksičnosti na osnovu prosečne specifične brzine rasta daje prednost, u ovu metoda ispitivanja uključene su i procene na osnovu prirasta kako bi se zadovoljili trenutni regulatorni zahtevi u nekim državama.

Procene toksičnosti zasnivati na broju frondova i jednoj dodatnoj mernoj promenljivoj (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa) budući da neke supstance znatno više utiču na neke druge merne promenljive nego na broj frondova. Taj bi uticaj ostao neotkriven kad bi se samo računao broj frondova.

Broj frondova kao i sve druge dokumentovane merne promenljive, tj. ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa, se unose u tabelu, zajedno sa koncentracijama ispitivane supstance pri svakom merenju. Kasnija analiza podataka, npr. za procenu vrednosti LOEC, NOEC ili ECx, zasniva se na vrednostima pojedinačnih ponavljanja, a ne na izračunatim srednjim vrednostima po ispitivanim grupama.

**2.2.1. Prosečna specifična brzina rasta**

Prosečna specifična brzina rasta za određeni period izračunava se kao logaritamsko povećanje promenljivih veličina rasta - broj frondova i još jedna merna promenljiva (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa) - primenom formule u daljem tekstu za svako ponavljanje u kontrolama i obradama:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *µ*i-j = | *ln(Nj)  ln(Ni)* |  |
| *t* |  |

pri čemu:

*µ*i-j jeste prosečna specifična brzina rasta od vremena i do vremena j;

Ni jeste merna promenljiva u ispitivanom ili kontrolnom sudu i u vremenu i;

Nj jeste merna promenljiva u ispitivanom ili kontrolnom sudu u vremenu j;

t jeste vremenski period od i do j.

Za svaku ispitivanu i kontrolnu grupu izračunati srednju vrednost brzine rasta sa procenom varijanse.

Prosečnu specifičnu brzinu rasta izračunati za čitav period ispitivanja (vreme "i" na navedenoj formuli jeste početak ispitivanja, a vreme "j" jeste kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu izračunati srednju vrednost specifične brzine rasta sa procenom varijanse. Osim toga, ocenjuje se etapna brzina rasta kako bi se ocenili efekti ispitivane supstance koji se javljaju tokom perioda izlaganja (npr. pregledom logaritamski transformiranih krivih rasta). Značajne razlike između etapne brzine rasta i prosečne brzine rasta ukazuju na odstupanje od stalnog eksponencijalnog rasta i upozoravaju da je potrebno detaljno preispitivanje kriva rasta. Konzervativniji pristup u ovakvim slučajevima bio bi da se uporede specifične brzine rasta obrađenih kultura u periodu maksimalne inhibicije sa specifičnim brzinama rasta kontrolnih kultura tokom istog perioda.

Procenat inhibicije brzine rasta (Ir) tada se može izračunati za svaku ispitivanu koncentraciju (ispitivanu grupu) prema formuli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %Ir = | (μC - μt) | x 100 |
| μC |

pri čemu:

% Ir jeste procenat inhibicije prosečne specifične brzine rasta;

μC jeste srednja vrednost u μ kontroli;

μT jeste srednja vrednost μ u ispitivanoj grupi.

**2.2.2. Prirast**

Efekti na prirast određuju se na osnovu dve merne promenljive, broja frondova i još jedne merne promenljive (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa) u svakom sudu za ispitivanje na početku i na kraju ispitivanja. Početna biomasa za suvu i svežu masu određuje se na osnovu uzorka frondova uzetih iz šarže koja se koristi za inokulaciju sudova za ispitivanje (videti odeljak 1.7.3. ove metode). Za svaku ispitivanu koncentraciju i kontrolu izračunati srednju vrednost prirasta sa procenom varijanse. Srednji procenat inhibicije prirasta (%Iy) za svaku ispitivanu grupu može se izračunati na sledeći način:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| %Iy = | (bC - bT) | x 100 |
| bC |

pri čemu:

% Iy jeste procenat smanjenja prirasta;

bC jeste konačna biomasa umanjena za početnu biomasu kontrolne grupe;

bT jeste konačna biomasa umanjena za početnu biomasu ispitivane grupe.

**2.2.3. Prikaz krivih koncentracija - odgovor**

Treba prikazati krive koncentracija-odgovor iz kojih je vidljiv odnos srednjeg procenta inhibicije promenljive odgovora (Ir ili Iy izračunat kako je prikazano u odeljku 2.2.1. ili u odeljku 2.2.2. ove metode) i logaritamske koncentracije ispitivane supstance.

**2.2.4. Procena ECx**

Procene ECx (npr. EC50) se zasnivaju i na prosečnoj specifičnoj brzini rasta (ErCx) i na prirastu (EyCx), a one opet na broju frondova i još jednoj mernoj promenljivoj (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa). To je stoga što neke ispitivane supstance ne utiču jednako na broj frondova i na druge merne promenljive. Odabrani parametri toksičnosti su stoga četiri vrednosti ECx za svaki izračunati nivo inhibicije x: ErCx (broj frondova); ErCx (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa); EyCx (broj frondova) i EyCx (ukupna površina frondova, suva masa ili sveža masa).

*2.4. STATISTIČKI POSTUPCI*

Cilj je da se dobije kvantitativni odnos koncentracija-odgovor regresionom analizom. Ako se izvrši linearna transformacija podataka odgovora - npr. u jedinice probit, logit ili Vejbulovog modela**16** - može se izvršiti ponderisana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije, koje bolje rešavaju problem neizbežnih nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih raspodela. Približavanjem nultoj ili potpunoj inhibiciji te nepravilnosti mogu transformacijom i dodatno da se povećaju i tako otežaju analizu**16**. Standardne analitičke metode koje koriste probit, logit ili Vibulove transformacije namenjene su kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i posebno se prilagođavaju da bi se mogle primeniti na podatke o brzini rasta ili prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrednosti ECx iz kontinuiranih podataka dati su u literaturi**17,18,19**.

Za svaku promenljivu odgovora koja se analizira izračunati procene tačaka za vrednosti ECx na osnovu odnosa koncentracija - odgovor. Po mogućstvu, za sve procene odrediti granice pouzdanosti 95%. Valjanost podudaranja podataka odgovora sa regresionim modelom procenjuje se grafički ili statistički. Regresionu analizu vršiti na osnovu pojedinačnih odgovora u ponavljanjima, a ne na osnovu srednjih vrednosti ispitivanih grupa.

Ako raspoloživi regresioni modeli/metodi nisu podesni za podatke, procene EC50 i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa metodom ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem (bootstrapping)**20**.

Za procenu LOEC, a time i NOEC, potrebno je uporediti srednje vrednosti obrada primenom tehnika analize varijanse (u daljem tekstu: ANOVA). Zatim srednju vrednost za svaku koncentraciju uporediti sa kontrolnom srednjom vrednošću primenom odgovarajuće metode višestrukog poređenja ili ispitivanja trenda. Ovde može biti koristan Danetov ili Vilijamsov test**21,22,23,24**. Treba proveriti da li je pretpostavka homogenosti varijansi ANOVA realna. Procena se može izvršiti grafički ili formalnim testom**25**. Pogodni su Leveneov i Bartletov test. Ako pretpostavka homogenosti varijansi nije zadovoljena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanse prevelika da bi se mogla ispraviti transformacijom, razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonkhereovi "step-down" testovi trenda. Dodatne smernice za određivanje NOEC date su u literaturi**19**.

Novija naučna saznanja dovela su do preporuke da se pojam NOEC napusti i zameni procenama tačaka ECx dobijenih regresijom. Za ovo ispitivanje sa *Lemna sp.* nije utvrđena određena vrednost x. Međutim, izgleda da je raspon od 10% do 20% odgovarajući (zavisno od odabrane promenljive odgovora), a poželjno je da se navedu obe vrednosti, EC10 i EC20.

**3. IZVEŠTAVANJE**

*3.1. IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU*

Izveštaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- agregatno stanje i fizičko-hemijska svojstva, uključujući granicu rastvorljivosti u vodi,

- podaci za identifikaciju hemikalije (npr. CAS broj), uključujući čistoću.

2) Ispitivanoj vrsti:

- naučni naziv, klon (ako je poznat) i izvor.

3) Uslovima ispitivanja:

- postupak ispitivanja (statički, polustatički ili protočni)

- datum početka i trajanje ispitivanja,

- podloga za ispitivanje,

- opis postavke ispitivanja: sudovi za ispitivanje i poklopci, zapremine rastvora, broj kolonija i frondova po sudu za ispitivanje na početku ispitivanja,

- ispitivane koncentracije (nominalne odnosno izmerene, po potrebi) i broj ponavljanja po koncentraciji,

- načini pripreme radnih i ispitivanih rastvora, uključujući korišćenje rastvarača odnosno sredstava za dispergovanje,

- temperatura tokom ispitivanja,

- izvor svetlosti, intenzitet svetla i homogenost,

- pH vrednosti ispitivanih i kontrolnih podloga,

- koncentracije ispitivane supstance i analitički metod sa odgovarajućim podacima za ocenu kvaliteta (validaciona istraživanja, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

- metodi određivanja broja frondova i drugih mernih promenljivih, npr. suva masa, sveža masa ili površina frondova,

- sva odstupanja od ove metode ispitivanja,

4) Rezultatima:

- neobrađeni rezultati: broj frondova i druge merne promenljive u svakom ispitivanom i kontrolnom sudu kod svakog posmatranja i analize,

- srednje vrednosti i standardne devijacije svih mernih promenljivih,

- krive rasta za svaku koncentraciju (po mogućstvu sa logaritamski transformisanom mernom promenljivom, videti odeljak 2.2.1. ove metode),

- vreme udvostručenja/brzina rasta u kontroli na osnovu broja frondova,

- izračunate promenljive odgovora za svako ponavljanje u obradama, uključujući srednje vrednosti i koeficijent varijacije za ponavljanja,

- grafički prikaz odnosa koncentracija/efekat,

- procene praćenih parametara toksičnosti za promenljive odgovora, npr. EC50, EC10, EC20 i odgovarajući intervali poverenja; Ako se izračunavaju, LOEC i/ili NOEC, njihove vrednosti i statističke metode koje su upotrebljene za određivanje,

- ako se koristi ANOVA, veličina efekta koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

- svaka stimulacija rasta u bilo kojoj obradi,

- svi vidljivi znaci fitotoksičnosti i zapažanja u ispitivanim rastvorima,

- tumačenje rezultata, uključujući mogući uticaj odstupanja od metode ispitivanja na rezultate ispitivanja.

**4. LITERATURA**

1. OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

2. The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\_document/information\_requirements\_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

5. USEPA - United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

6. AFNOR - Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de Lemna minor. 10pp.

7. SSI - Swedish Standards Institute. (1995). Water quality - Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

8. Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor. EPS 1/RM/37-120 pp.

9. Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999). The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc - Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality - Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (Lemna minor) - Duckweed Growth Inhibition Test.

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (Lemna minor L.). Environmental Research Laboratory - Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (Lemna minor) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

15. Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

18. Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

19. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

21. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

22. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

23. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

24. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

25. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

**Deo drugi**

**DODATAK 1.**

Opis *Lemna spp.*

Vodena biljka poznata pod nazivom sočivica, *Lemna spp.*, pripada porodici *Lemnaceae*, u koju se ubrajaju različite vrste rasprostranjene širom sveta koje su podeljene u četiri roda. Njihov izgled i taksonomija su iscrpno opisani**1,2**. *Lemna gibba* i *L. minor* su predstavnici umerenog klimatskog pojasa i vrlo često se koriste u toksikološkim ispitivanjima. Obe vrste imaju plutajuću ili potopljenu diskoidnu stabljiku (frond) i vrlo tanak koren koji izbija iz sredine naličja fronda. *Lemna spp.* retko cvetaju, a biljke se vegetativno razmnožavaju stvaranjem novih frondova**3**. U poređenju sa starijim biljkama, mlađe biljke su uglavnom bleđe, imaju kraće korenje i sastoje se od dva do tri fronda različite veličine. Biljke sočivice su veoma pogodne za laboratorijska ispitivanja zahvaljujući maloj veličini, jednostavnoj građi, bespolnom razmnožavanju i kratkom vremenu generacije**4,5**.

Zbog verovatnih razlika u osetljivosti među vrstama validna su samo poređenja osetljivosti unutar iste vrste.

Primeri vrsta roda Lemna koje su korišćene u ispitivanjima: referentni spisak

*Lemna aequinoctialis*: Eklund, B. (1996). The use of the red alga Ceramium strictum and the duckweed Lemna aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

*Lemna major:* Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of Lemna major as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

*Lemna minor:* United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor.* 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality - Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

*Lemna gibba:* ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

*Lemna paucicostata:* Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). Lemna (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of Lemna paucicostata to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

*Lemna perpusilla:* Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (Lemna perpusilla). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

*Lemna trisulca:* Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

*Lemna valdiviana:* Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Izvori vrsta roda *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria

Department of Botany, University of Toronto  
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2  
Tel. +1-416-978-3641  
Fax +1-416-978-5878  
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca  
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University  
Forestry Dept  
Duckweed Culture Collection  
Campus Box 8002  
Raleigh, NC 27695-8002  
SJEDINJENE AMERIČKE DRŽAVE  
Tel. 001 (919) 515-7572  
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE-106 91 Stockholm  
ŠVEDSKA  
Tel. +46 86747240  
Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)  
FG III 3.4  
Schichauweg 58  
12307 Berlin  
NEMAČKA  
e-mail: lemna@uba.de  
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Literatura

1. Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (Lemnaceae family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

**DODATAK 2.  
Održavanje radne kulture**

Radne kulture se na nižoj temperaturi (4 °C do 10 °C) mogu duže vreme držati bez presejavanja. Kao hranljiva podloga za radne kulture *Lemna* može se koristiti podloga koja se koristi u ispitivanju, ali moguće je koristiti i druge podloge bogate hranljivim materijama.

Određeni broj mladih svetlozelenih biljaka se povremeno premešta u nove sudove za uzgajanje sa svežom podlogom primenom aseptičkih postupaka. U hladnijim uslovima, kakvi se ovde preporučuju, presađivanje se može vršiti u razmacima do tri meseca.

Koriste se hemijski čisti (očišćeni kiselinom) i sterilni stakleni sudovi za uzgajanje, a kod rukovanja se primenjuju aseptički postupci. Ako dođe do zagađenja radne kulture npr. algama ili gljivicama, preduzeti potrebne mere za uklanjanje zagađujućih organizama. U slučaju algi i većine drugih zagađujućih organizama, to se može postići površinskom sterilizacijom. Uzme se uzorak zagađenog biljnog materijala i odseče korenje. Materijal se zatim snažno protrese u čistoj vodi i uroni u 0,5%-tni (v/v) rastvor natrijum hipohlorita, 30 sekundi do 5 minuta. Biljni materijal se zatim ispere sterilnom vodom i prenese u više šarži u sudove za uzgajanje koje sadrže svežu hranljivu podlogu. U ovom postupku mnogi listovi će uginuti, naročito kod dužeg vremena izlaganja, ali neki od preživelih potrebno je da budu nezagađeni. Oni se zatim ponovo mogu koristiti za inokulisanje novih kultura.

**DODATAK 3.  
Podloge**

Za vrste *L. minor* i *L. gibba* preporučuju se različite hranljive podloge. Za *L. minor* se preporučuje prilagođena varijanta podloge prema švedskom standardu (SIS), a za *L. gibba* podloga 20X AAP. Sastav obe podloge dat je u daljem tekstu. Kod pripreme ovih podloga koristiti hemikalije čistoće PA ("pro analysis") odnosno hemikalije analitičke čistoće i dejonizovanu vodu.

Hranljiva podloga za vrste roda *Lemna* prema švedskom standardu (SIS)

Radni rastvori I-V se sterilišu obradom u autoklavu (120° C, 15 minuta) ili membranskom filtracijom (veličina pora oko 0,2 μm).

Rastvor VI (i opciono VII) se sterilišu isključivo membranskom filtracijom; oni se ne smeju sterilisati u autoklavu.

Sterilni radni rastvori se čuvaju na hladnom i mračnom mestu. Radne rastvore I-V baciti nakon šest meseci, dok rastvori VI (i opciono VII) imaju rok upotrebe 1 mesec.

Tabela

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Radni rastvor br. | Supstanca | Koncentracija u radnom  rastvoru (g·l-1) | Koncentracija u pripremljenoj podlozi (mg·l-1) | Pripremljena podloga | |
| Element | Koncentracija (mg·l-1) |
| I | NaNO3 KH2PO4 | 8,50 1,34 | 85 13,4 | Na; N K; P | 32; 14 6,0; 2,4 |
| II | MgSO4 · 7H2O | 15 | 75 | Mg; S | 7,4; 9,8 |
| III | CaCl2 · 2H2O | 7,2 | 36 | Ca; Cl | 9,8; 17,5 |
| IV | Na2CO3 | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | H3BO3 MnCl2 · 4H2O Na2MoO4 · 2H2O ZnSO4 · 7H2O  CuSO4 · 5H2O  Co(NO3)2 · 6H2O | 1,0 0,20 0,010 0,050  0,0050  0,010 | 1,00 0,20 0,010 0,050 0,0050 0,010 | B Mn Mo Zn Cu Co | 0,17 0,056 0,0040  0,011 0,0013 0,0020 |
| VI | FeCl3 · 6H2O  Na2-EDTA·2H2O | 0,17 0,28 | 0,84 1,4 | Fe - | 0,17 - |
| VII | MOPS (pufer) | 490 | 490 | - | - |

Da bi se dobio jedan litar podloge SIS, u 900 ml dejonizovane vode doda se:

- 10 ml radnog rastvora 1

- 5 ml radnog rastvora II

- 5 ml radnog rastvora III

- 5 ml radnog rastvora IV

- 1 ml radnog rastvora V

- 5 ml radnog rastvora VI

- 1 ml radnog rastvora VII (opciono)

Napomena: Kod nekih supstanci potreban je još jedan radni rastvor VII (pufer MOPS) (videti poslednji stav u odeljku 1.4. ove metode).

pH vrednost se podesi na 6,5 ± 0,2 pomoću 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH, i dopuni dejonizovanom vodom do zapremine od jednog litra.

Hranljiva podloga 20X AAP

Radni rastvori se pripremaju u sterilnoj destilovanoj ili dejonizovanoj vodi.

Sterilni radni rastvori se čuvaju na hladnom i mračnom mestu. U tim uslovima radni rastvori će imati rok upotrebe najmanje 6 do 8 nedelja.

Za podlogu 20X - AAP pripremiti pet radnih rastvora sa hranljivim materijama (A1, A2, A3, B i C) koristeći reagensno čiste hemikalije. Hranljiva podloga se dobija tako što se u približno 850 ml dejonizovane vode doda po 20 ml svakog od radnih rastvora sa hranljivim materijama. - pH vrednost se podesi na 7,5 ± 0,1 pomoću 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH, i dopuni dejonizovanom vodom do zapremine od jednog litra. Zatim se podloga profiltrira u sterilnu posudu kroz membranski filter (približno) 0,2 mm.

Hranljivu podlogu za ispitivanje pripremiti 1-2 dana pre upotrebe kako bi se stabilizovala pH vrednost. pH vrednost hranljive podloge proveriti pre upotrebe i prema potrebi podesiti dodavanjem 0,1 ili 1 M NaOH ili HCl kako je navedeno u gornjem tekstu.

Tabela

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Radni rastvor br. | Supstanca | Koncentracija u radnom rastvoru (g·l-1)\* | Koncentracija u pripremljenoj podlozi (mg·l-1)\* | Pripremljena podloga | |
| Element | Koncentra-cija (mg·l-1)\* |
| A1 | NaNO3 MgCl2·6H2O CaCl2·2H2O | 26 12 4,4 | 510 240 90 | Na; N Mg Ca | 190; 84 58,08 24,04 |
| A2 | MgSO4·7H2O | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | K2HPO4·3H2O | 1,4 | 30 | K; P | 9,4;3,7 |
| B | H3BO3 MnCl2·4H2O FeCl3·6H2O Na2EDTA·2H2O ZnCl2 CoCl2·6H2O Na2MoO4·2H2O CuCl2·2H2O | 0,19 0,42 0,16 0,30 3,3 mg·l-1 1,4 mg·l-1 7,3mg·l-1 0,012 mg·l-1 | 3,7 8,3 3,2 6,0 66 μg·l-1 29 μg·l-1 145 μg·l-1 0,24 μg·l-1 | B Mn Fe - Zn Co Mo Cu | 0,65 2,3 0,66 - 31 μg·l-1 7,1 μg·l-1 58 μg·l-1 0,080 μg·l-1 |
| C | NaHCO3 | 15 | 300 | Na; C | 220; 43 |
| Napomena: Teoretski odgovarajuća konačna koncentracija bikarbonata (kojom se izbegavaju značajnija podešavanja pH vrednosti) je 15 mg/l, a ne 300 mg/l. Prethodna iskustva s upotrebom podloge 20X-AAP, uključujući međunarodno međulaboratorijsko ispitivanje za ovu metodu, zasnivaju se na 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R & D Technical Report EMA 003. WRc plc - Environment Agency. \*Ako nije drugačije navedeno | | | | | |

Podloga ŠTAJNBERG (prema standardu ISO 20079)

Koncentracije i radni rastvori

Modifikovana podloga Štajnberg je u standardu ISO 20079 predviđena samo za *Lemna minor* (budući da je tamo jedino i dozvoljena vrsta *Lemna minor*), ali ispitivanja su pokazala da se i sa vrstom *Lemna gibba* mogu postići dobri rezultati.

Kod pripreme ove podloge koristiti hemikalije čistoće PA ("pro analysis" odnosno hemikalije analitičke čistoće i dejonizovanu vodu.

Hranljiva podloga se priprema iz radnih rastvora ili 10-struko koncentrisane podluge kako bi se dobila maksimalna koncentracija podloge koja se može postići bez taloženja.

Tabela 1. pH-stabilizovana podloga ŠTAJNBERG (varijanta prema Altenburgeru)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Supstanca | | Hranljiva podloga | |
| Makroelementi | molarna masa | mg/l | mmol/l |
| KNO3 | 101,12 | 350,00 | 3,46 |
| Ca(NO3)2 · 4H2O | 236,15 | 295,00 | 1,25 |
| KH2PO4 | 136,09 | 90,00 | 0,66 |
| K2HPO4 | 174,18 | 12,60 | 0,072 |
| MgSO4 · 7H2O | 246,37 | 100,00 | 0,41 |
| Mikroelementi | molarna masa | µg/l | µmol/l |
| H3BO3 | 61,83 | 120,00 | 1,94 |
| ZnSO4 · 7H2O | 287,43 | 180,00 | 0,63 |
| Na2MoO4 · 2H2O | 241,92 | 44,00 | 0,18 |
| MnCl2 · 4H2O | 197,84 | 180,00 | 0,91 |
| FeCl3 · 6H2O | 270,21 | 760,00 | 2,81 |
| EDTA dinatrijum dihidrat | 372,24 | 1500,00 | 4,03 |

Tabela 2. Radni rastvori (makroelementi)

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Makroelementi (50-struko koncentrisano) | g/l |
| Radni rastvor 1: KNO3 KH2PO4 K2HPO4 | 17,50 4,5 0,63 |
| Radni rastvor 2: MgSO4 · 7H2O | 5,00 |
| Radni rastvor 3: Ca(NO3)2 · 4H2O | 14,75 |

Tabela 3. Radni rastvori (mikroelementi)

|  |  |
| --- | --- |
| 2. Mikroelementi (1000-struko koncentrisano) | mg/l |
| Radni rastvor 4: H3BO3 | 120,0 |
| Radni rastvor 5: ZnSO4 · 7H2O | 180,0 |
| Radni rastvor 6: Na2MoO4 · 2H2O | 44,0 |
| Radni rastvor 7: MnCl2 · 4H2O | 180,0 |
| Radni rastvor 8: FeCl3 · 6H2O | 760,00 |
| EDTA dinatrijum dihidrat | 1500,00 |

Radni rastvori 2 i 3 mogu se objediniti, kao i radni rastvori 4-7 (uzimajući u obzir tražene koncentracije).

Za duži rok upotrebe radne rastvore obraditi u autoklavu 20 minuta na temperaturi od 121°C ili izvršiti sterilnu filtraciju (0,2 µm). Za radni rastvor 8 u svakom slučaju se preporučuje sterilna filtracija (0,2 µm).

Priprema konačne koncentracija podloge ŠTAJNBERG (modifikovana)

20 ml radnih rastvora 1, 2 i 3 (videti Tabelu 2) doda se u oko 900 ml dejonizovane vode kako bi se izbeglo taloženje;

Doda se 1,0 ml radnih rastvora 4, 5, 6, 7 i 8 (videti Tabelu 3);

pH vrednost da bude 5,5 ± 0,2 (podesiti dodavanjem minimalne zapremine rastvora NaOH ili HCl);

Dopuni se vodom do 1000 ml;

Ako su radni rastvori sterilisani i koristi se odgovarajuća voda, nije potrebna dodatna sterilizacija. Ako se sterilizacija vrši na konačnoj podlozi, radni rastvor 8 dodati nakon obrade u autoklavu (20 minuta na 121 °C).

Priprema 10-struko koncentrisane podloge ŠTAJNBERG (modifikovana) za međuskladištenje

20 ml radnih rastvora 1, 2 i 3 (videti Tabelu 2) doda se u oko 30 ml vode kako bi se izbeglo taloženje;

Doda se 1,0 ml radnih rastvora 4, 5, 6, 7 i 8 (videti Tabelu 3);

Dopuni se vodom do 100 ml;

Ako su radni rastvori sterilisani i koristi se odgovarajuća voda, nije potrebna dodatna sterilizacija. Ako se sterilizacija vrši na konačnoj podlozi, radni rastvor 8 dodati nakon obrade u autoklavu (20 minuta na 121°C);

pH vrednost podloge (konačna koncentracija) da bude 5,5 ± 0,2.