

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA<sup>1)</sup>

z dnia 21 listopada 2005 r.

**zmieniające rozporządzenie w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych<sup>2)</sup>**

Na podstawie art. 24 ust. 2 pkt 1 ustawy z dnia 11 stycznia 2001 r. o substancjach i preparatach chemicznych (Dz. U. Nr 11, poz. 84, z późn. zm.<sup>3)</sup>) zarządza się, co następuje:

§ 1. W rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. Nr 232, poz. 2343) wprowadza się następujące zmiany w załączniku do rozporządzenia:

- 1) „Spis metod” otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 1 do niniejszego rozporządzenia;
- 2) w części A po pozycji „A.20 Rozpuszczanie/ekstrakcja polimerów w wodzie” dodaje się pozycję

„A.21. Właściwości utleniające (ciecze)” w brzmieniu określonym w załączniku nr 2 do niniejszego rozporządzenia;

3) w części B:

- a) pozycja B.1.BIS. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 3 do niniejszego rozporządzenia,
- b) pozycja B.1.TRIS. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 4 do niniejszego rozporządzenia,
- c) pozycja B.4. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 5 do niniejszego rozporządzenia,
- d) pozycja B.5. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 6 do niniejszego rozporządzenia,
- e) pozycja B.31. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 7 do niniejszego rozporządzenia,
- f) pozycja B.35. otrzymuje brzmienie określone w załączniku nr 8 do niniejszego rozporządzenia,
- g) po pozycji „B.41. Fototoksyczność *in vitro* — test wychwyty czerwieni obojętnej 3T3” dodaje się pozycję:  
— „B.42. Uczulanie skóry: próba na miejscowym węźle chłonnym” w brzmieniu określonym w załączniku nr 9 do niniejszego rozporządzenia,

<sup>1)</sup> Minister Zdrowia kieruje działem administracji rządowej — zdrowie, na podstawie § 1 ust. 2 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 31 października 2005 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr 220, poz. 1901).

<sup>2)</sup> Niniejsze rozporządzenie dokonuje w zakresie swojej regulacji wdrożenia dyrektywy 2004/73/WE z dnia 29 kwietnia 2004 r. dostosowującej po raz 29 do postępu technicznego dyrektywę 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych (Dz. Urz. WE L 152 z 30.04.2004 r.).

<sup>3)</sup> Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2001 r. Nr 100, poz. 1085, Nr 123, poz. 1350 i Nr 125, poz. 1367, z 2002 r. Nr 135, poz. 1145 i Nr 142, poz. 1187, z 2003 r. Nr 189, poz. 1852, z 2004 r. Nr 96, poz. 959 i Nr 121, poz. 1263 oraz z 2005 r. Nr 179, poz. 1485.

- „B.43 Badanie neurotoksyczności na gryzoniach” w brzmieniu określonym w załączniku nr 10 do niniejszego rozporządzenia;
- 4) w części C po pozycji „C.20. Rozmnażanie rozwielitki (*Daphnia magna* sp.)” dodaje się pozycje:
- a) „C.21. Mikroorganizmy glebowe: Badanie przemian azotu” — w brzmieniu określonym w załączniku nr 11 do niniejszego rozporządzenia,
- b) „C.22. Mikroorganizmy glebowe: Badanie przemian węgla” — w brzmieniu określonym w załączniku nr 12 do niniejszego rozporządzenia,
- c) „C.23. Przemiany tlenowe i beztlenowe w glebie” — w brzmieniu określonym w załączniku nr 13 do niniejszego rozporządzenia,
- d) „C.24. Przemiany tlenowe i beztlenowe w osadach wodnych” — w brzmieniu określonym w załączniku nr 14 do niniejszego rozporządzenia.
- § 2. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Zdrowia: *Z. Religa*

Załączniki do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 21 listopada 2005 r. (poz. 2119)

Załącznik nr 1

## SPIS METOD

### Część A. Metody przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych

- A.1. Temperatura topnienia/krzepnięcia
- A.2. Temperatura wrzenia
- A.3. Gęstość względna
- A.4. Prężność par
- A.5. Napięcie powierzchniowe
- A.6. Rozpuszczalność w wodzie
- A.8. Współczynnik podziału
- A.9. Temperatura zapłonu
- A.10. Palność (substancje i preparaty chemiczne stałe)
- A.11. Palność (gazy)
- A.12. Palność (w kontakcie z wodą)
- A.13. Właściwości piroforyczne ciał stałych i cieczy
- A.14. Właściwości wybuchowe
- A.15. Temperatura samozapłonu (ciecze i gazy)
- A.16. Względna temperatura samozapalenia substancji/preparatów chemicznych stałych
- A.17. Właściwości utleniające (substancje/preparaty chemiczne stałe)
- A.18. Liczbowo średnia masa cząsteczkowa i rozkład masy cząsteczkowej polimerów
- A.19. Zawartość polimerów o małej masie cząsteczkowej
- A.20. Rozpuszczanie/ekstrakcja polimerów w wodzie
- A.21. Właściwości utleniające (ciecze)

### Część B. Metody oznaczania toksyczności i innych skutków zdrowotnych

- B.1.BIS. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) — Metoda Ustalonej Dawki
- B.1.TRIS. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) — Metoda Klas Toksyczności Ostrej
- B.2. Toksyczność ostra (inhalacyjna)
- B.3. Toksyczność ostra (narażenie przez skórę)
- B.4. Toksyczność ostra: działanie drażniące/żrące na skórę
- B.5. Toksyczność ostra: działanie drażniące/żrące na oko
- B.6. Toksyczność ostra (uczulenie skóry)
- B.7. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga pokarmowa)
- B.8. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga inhalacyjna)
- B.9. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, po podaniu na skórę)
- B.10. Mutagenność (test aberracji chromosomowych *in vitro* na komórkach ssaków)
- B.11. Mutagenność (test aberracji chromosomowych na komórkach szpiku kostnego ssaków)
- B.12. Mutagenność (test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo*)
- B.13/14. Mutagenność (test rewersji mutacji na bakteriach)
- B.15. Mutagenność (test mutacji genowych na komórkach *Saccharomyces cerevisiae*)
- B.16. Mutagenność (test rekombinacji mitotycznych na komórkach *Saccharomyces cerevisiae*)
- B.17. Mutagenność (test mutacji genowych na komórkach ssaków)

- B.18. Uszkodzenie i naprawa DNA — Nieplanowa synteza DNA — Badanie na komórkach ssaków *in vitro*
- B.19. Test wymiany chromatyd siostrzanych *in vitro*
- B.20. Recesywne mutacje letalne związane z płcią u *Drosophila melanogaster*
- B.21. Transformacja komórek ssaków *in vitro*
- B.22. Dominujące mutacje letalne u gryzoni
- B.23. Aberracje chromosomowe spermatogoniów ssaków
- B.24. Test plamkowy u myszy
- B.25. Test dziedzicznych translokacji u myszy
- B.26. Toksyczność podchroniczna (90-dniowe powtarzane narażenie gryzoni drogą pokarmową)
- B.27. Toksyczność podchroniczna (90-dniowe powtarzane narażenie drogą pokarmową zwierząt z gatunków innych niż gryzoni)
- B.28. Toksyczność podprzewlekła — narażenie przez skórę (90-dniowe powtarzane narażenie na skórę u gryzoni)
- B.29. Toksyczność podprzewlekła — narażenie inhalacyjne (90-dniowe powtarzane narażenie inhalacyjne u gryzoni)
- B.30. Toksyczność przewlekła
- B.31. Badanie toksyczności w rozwoju przedporodowym
- B.32. Działanie rakotwórcze
- B.33. Toksyczność przewlekła/działanie rakotwórcze
- B.34. Działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu jednopokoleniowego
- B.35. Działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu dwupokoleniowego
- B.36. Toksykokinetyka
- B.37. Opóźniona neurotoksyczność związków fosforoorganicznych po narażeniu ostrym
- B.38. Opóźniona neurotoksyczność związków fosforoorganicznych po dawce powtarzanej — 28-dniowej
- B.39. Nieplanowana synteza DNA na komórkach wątroby ssaków
- B.40. Działanie żrące na skórę
- B.41. Fototoksyczność *in vitro* — test wychwytu czerwieni obojętnej 3T3
- B.42. Uczulanie skóry: próba na miejscowym węźle chłonnym
- B.43. Badanie neurotoksyczności na gryzoniach

### Część C. Metody przeprowadzenia badań ekotoksyczności

- C.1. Toksyczność ostra (dla ryb)
- C.2. Toksyczność ostra (dla rozwielitek — *Daphnia sp.*)
- C.3. Hamowanie wzrostu glonów
- C.4. Podatność na biodegradację
  - C.4.I. Uwagi ogólne
  - C.4.II. Zanikanie RWO (Metoda C.4—A)
  - C.4.III. Zmodyfikowane badanie przesiewowe wg OECD (Metoda C.4—B)
  - C.4.IV. Wydzielanie CO<sub>2</sub> (Metoda C.4—C)
  - C.4.V. Metoda respirometrii manometrycznej (Metoda C.4—D)
  - C.4.VI. Metoda naczynia zamkniętego (Metoda C.4—E)
  - C.4.VII. Metoda M.I.T.I. (Metoda C.4—F)
- C.5. Degradacja — biochemiczne zapotrzebowanie na tlen
- C.6. Degradacja — chemiczne zapotrzebowanie na tlen
- C.7. Degradacja — abiotyczny rozkład przez hydrolizę w zależności od pH
- C.8. Toksyczność dla dżdżownic. Badanie w sztucznej glebie
- C.9. Biodegradacja. Test Zahn-Wellensa
- C.10. Biodegradacja. Badania symulacyjne osadu czynnego
- C.11. Biodegradacja. Badania stopnia hamowania oddychania osadu czynnego
- C.12. Biodegradacja. Zmodyfikowany test SCAS
- C.13. Biokoncentracja. Badanie przepływowo na rybach
- C.14. Badanie wzrostu narybku
- C.15. Krótkoterminowa toksyczność na zarodkach ryb i stadiach narybku
- C.16. Badanie toksyczności ostrej drogą pokarmową na pszczołach miodnych
- C.17. Badanie toksyczności ostrej kontaktowej na pszczołach miodnych
- C.18. Adsorpcja/desorpcja metodą wyznaczania stanu równowagi
- C.19. Wyznaczanie współczynnika adsorpcji (K<sub>OC</sub>) na glebie i osadzie ściekowym za pomocą chromatografii cieczowej (HPLC)
- C.20. Rozmnażanie rozwielitki (*Daphnia magna sp.*)
- C.21. Mikroorganizmy glebowe: badanie przemian azotu
- C.22. Mikroorganizmy glebowe: badanie przemian węgla
- C.23. Przemiany tlenowe i beztlenowe w glebie
- C.24. Przemiany tlenowe i beztlenowe w osadach wodnych

## A.21. WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIECZE)

### 1. METODA

#### 1.1. Wstęp

Niniejsza metoda badania jest przewidziana do pomiaru zdolności cieczy do zwiększenia szybkości spalania lub intensywności spalania materiałów palnych lub do tworzenia mieszanin z materiałami palnymi, które ulegają samozapaleniu, jeżeli takie dwa składniki zostaną dokładnie zmieszane. Opiera się ona na metodzie ONZ przewidzianej dla cieczy utleniających (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa) i jest z nią równoważna. Jednakże, metoda ta jako A.21 przewidziana jest przede wszystkim do spełnienia wymagań dyrektywy 67/548; wymagane jest porównanie tylko z jedną substancją kontrolną. Badanie i porównanie z dodatkową substancją kontrolną może być konieczne, jeżeli przewiduje się zastosowanie wyników badań do innych celów<sup>1</sup>.

Badania nie trzeba wykonywać, jeżeli z budowy strukturalnej substancji można wnioskować o tym, że substancja nie reaguje egzotermicznie z materiałem palnym.

Przed wykonaniem badania wskazane jest poznanie informacji o właściwościach wybuchowych substancji/preparatów chemicznych.

Metody nie należy stosować do badań substancji/preparatów chemicznych stałych, gazowych, wybuchowych, wysoce łatwopalnych oraz nadtlenków organicznych.

Niniejsze badanie nie musi być przeprowadzane, jeżeli dostępne są wyniki badania cieczy według metody ONZ dla cieczy utleniających (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa).

#### 1.2. Definicje i jednostki

**Średni czas narastania ciśnienia** jest średnią ze zmierzonych czasów narastania ciśnienia dla mieszanin podatnych w warunkach oznaczenia do powodowania wzrostu ciśnienia od 690 kPa do 2070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego.

#### 1.3. Substancje kontrolne

Jako substancję<sup>2</sup> kontrolną stosuje się 65 % (masowo) roztwór wodny kwasu azotowego (czystość analityczna).

Alternatywnie, jeżeli badający przewiduje, że wyniki takiego badania mogą być wykorzystane do innych celów<sup>1</sup>, to może uznać za zasadne przeprowadzenie badania z dodatkową substancją kontrolną<sup>3</sup>.

#### 1.4. Zasada metody badawczej

Badaną ciecz miesza się w stosunku 1:1 (masowo), z włóknami celulozy i umieszcza się w naczyniu ciśnieniowym. Jeżeli podczas mieszania lub napełniania naczynia nastąpi samozapalenie, to dalsze prowadzenie badania nie jest konieczne.

Jeżeli samozapalenie nie nastąpiło, to powinno być przeprowadzone pełne badanie. Mieszaninę ogrzewa się w naczyniu ciśnieniowym i oznacza się średni czas narastania ciśnienia od 690 kPa do 2070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego. Uzyskany czas porównuje się ze średnim czasem narastania ciśnienia dla mieszaniny 1:1 (masowo) substancji kontrolnej(ych) i celulozy.

#### 1.5. Kryteria wiarygodności badań

W serii pięciu prób dla jednej substancji nie powinno być wyników różniących się o więcej niż 30 % od średniej arytmetycznej. Wyniki różniące się o więcej niż 30 % od średniej arytmetycznej powinny być odrzucone, a procedury mieszania i napełniania powinny zostać skorygowane, a badanie powtórzone.

#### 1.6. Opis metody badawczej

##### 1.6.1. Czynności przygotowawcze

##### 1.6.1.1. Materiał palny

Jako materiał palny stosuje się wysuszone włókna celulozy o długości włókna pomiędzy 50 i 250  $\mu\text{m}$  oraz przeciętnej średnicy 25  $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>. Powinny być one wysuszone do stałej wagi w warstwie nie grubszej niż 25 mm w 105 °C przez 4 godz. i przechowywane w eksykatorze, ze środkiem suszącym, aż do ochłodzenia i osiągnięcia stanu wymaganego do stosowania. Zawartość wody w wysuszonej celulozie powinna być niższa niż 0,5 % (masowo) w przeliczeniu na suchą masę<sup>5</sup>. Jeżeli to konieczne, czas suszenia powinien być przedłużony aż do osiągnięcia tej wartości<sup>6</sup>. Ta sama partia celulozy powinna być stosowana podczas całego badania.

##### 1.6.1.2. Aparatura

##### 1.6.1.2.1. Naczynie ciśnieniowe

Wymagane jest naczynie ciśnieniowe. Aparat składa się z cylindrycznego stalowego naczynia ciśnieniowego o długości 89 mm i średnicy zewnętrznej 60 mm

<sup>4</sup> Np. Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalog nr 4021 050.

<sup>5</sup> Potwierdzone np. za pomocą miareczkowania metodą Karl-Fisher'a.

<sup>6</sup> Alternatywnie, wskazana zawartość wody może być również osiągana np. przez ogrzewanie w 105 °C pod obniżonym ciśnieniem przez 24 h.

<sup>1</sup> Np. w ramach przepisów transportowych ONZ.

<sup>2</sup> Przed badaniem kwas powinien być zmiareczkowany w celu potwierdzenia stężenia.

<sup>3</sup> Według odsyłaacza<sup>1</sup> stosowane są np.: 50 % (w/w) kwas nadchlorowy i 40 % (w/w) chloran sodu.



(patrz rysunek A.21.1). Na przeciwnych stronach znajdują się dwie płaszczyzny (zmniejszające przekrój naczynia do 50 mm) w celu ułatwienia trzymania podczas zakładania głowiczki zapalającej i odpowietrznika. Naczynie, które ma wywiercony otwór o średnicy 20 mm, z jednego końca nagwintowany do głębokości 19 mm gwintem 1, „zgodnie z normą British Standard Pipe (BSP) lub jego odpowiednikiem metrycznym. Odprowadzenie ciśnienia, w postaci bocznego ramienia, jest wkręcane w zakrzywioną powierzchnię naczynia ciśnieniowego 35 mm od jednego końca i pod kątem 90° do powierzchni uchwytych. Na końcu ramienia bocznego jest wywiercone gniazdo na głębokość 12 mm i nagwintowane gwintem 1/2", zgodnie z BSP lub jego odpowiednikiem metrycznym. Jeżeli jest to konieczne, uszczelnienie wewnętrzne zawiera uszczelnkę gazoszczelną. Ramię boczne wchodzi 55 mm w głąb korpusu naczynia ciśnieniowego i ma otwór o średnicy 6 mm. Koniec ramienia bocznego jest nagwintowany w celu unieruchomienia czujnika ciśnienia. Do pomiaru ciśnienia może być użyte dowolne urządzenie, pod warunkiem że nie jest wrażliwe na gorące gazy lub produkty rozkładu i jest odpowiednie do odczytu szybkości narastania ciśnienia w przedziale 690—2070 kPa, w okresie nie dłuższym niż 5 ms. Najdalszy od ramienia bocznego koniec naczynia ciśnieniowego jest zamykany głowiczką zapalającą, wyposażoną w dwie elektrody, jedna odizolowana od korpusu, a druga uziemiająca jest z nim połączona. Drugi koniec naczynia ciśnieniowego jest zamykany aluminiową membraną rozrywającą o grubości 0,2 mm (ciśnienie rozrywające wynosi ok. 2200 kPa) zamocowaną w gnieździe za pomocą korka z otworem 20 mm. Jeżeli to konieczne, pod głowiczką zapalającą stosuje się obojętne uszczelnienie w celu zapewnienia hermeticznego. Urządzenie podtrzymujące (rysunek A.21.2) umożliwi właściwą pozycję zestawu podczas badania. Zwykle składa się ono z płytki z miękkiej stali o wymiarach 235 mm x 184 mm x 6 mm z przymocowanym do niej wspornikiem o długości 185 mm i wyprofilowanym kwadratowo zagłębieniem na naczynie ciśnieniowe o wymiarach 70 mm x 70 mm x 4 mm. Ściany boczne wyprofilowanego kwadratowo wspornika są nacięte na dwóch przeciwległych stronach na jednym końcu jego długości tak, że konstrukcja ma dwie płaskie boczne nogi wznoszące się na wysokość 86 mm ponad nienaruszony przekrój wspornika. Dwie końce tych płaskich ścian są obcięte pod kątem 60° do poziomu i przyspawane do płytki podstawy. Po jednej stronie górnej części podstawy przekroju wspornika wykonana jest szczelina o wymiarach 22 mm szerokości i 46 mm głębokości tak, że gdy zestaw naczynia ciśnieniowego jest opuszczany w głąb wspornika, najpierw podparty jest we wsporniku zacisk zapalający, a boczne ramie umieszczone jest w tej szczelinie. Podkładka stalowa o długości 30 mm i grubości 6 mm jest dospawana do dolnej wewnętrznej części przedniej wspornika, która działa jako przekładka dystansowa. Dwie śruby 7 mm z płaskim łbem (lub motylkowe) wkręcane w ścianę przeciwległą służą do mocowania naczynia ciśnieniowego w miejscu. Dwie 12 mm szerokości taśmy stalowe o grubości 6 mm, przyspawane do części bocznych, stykają się z podstawą wspornika, podpierając naczynie ciśnieniowe od dołu.

#### 1.6.1.2.2. Układ zapalający

Układ zapalający zawiera drut Ni/Cr o długości 25 cm, średnicy 0,6 mm i oporności 3,85 ohm/m. Drut zwija się, za pomocą pręta o średnicy 5 mm w spiralę i przymocowuje się do elektrod głowiczki zapalającej. Spirala powinna mieć jedną z form pokazanych na rysunku A.21.3. Odległość pomiędzy dnem naczynia a dolną częścią spirali powinna wynosić 20 mm. Jeżeli elektrody nie są nastawialne, to końce drutu zapalającego pomiędzy spiralą a dnem naczynia powinny być odizolowane za pomocą ceramicznej gilzy. Drut rozgrzewa się wskutek przepływu prądu stałego o natężeniu co najmniej 10 A.

#### 1.6.2. Wykonanie badania<sup>7</sup>

Urządzenie, zestawione razem z czujnikiem ciśnienia i układem grzewczym, ale bez membrany rozrywającej umieszczonej na miejscu, jest podtrzymywane od dołu przez głowiczkę zapalającą. Badaną ciecz w ilości 2,5 g miesza się z 2,5 g wysuszonej celulozy w szklanej zlewce za pomocą szklanej bagietki<sup>8</sup>. Ze względów bezpieczeństwa, mieszanie powinno być przeprowadzone spoza osłony pomiędzy wykonawcą a mieszaniną. Jeżeli mieszanina zapali się podczas mieszania lub napełniania, dalsze wykonywanie badania nie jest konieczne. Mieszaninę dodaje się, małymi porcjami przez zawór, do naczynia ciśnieniowego w sposób gwarantujący, że mieszanina została ułożona wokół spirali zapalającej i jest z nią w dobrym kontakcie. Ważne jest, aby spirala nie została zniekształcona podczas operacji napełniania, co może mieć wpływ na uzyskanie błędnych wyników<sup>9</sup>.

Membranę rozrywającą umieszcza się na miejscu i zabezpiecza się ją, wkręcając korek w celu uszczelnienia. Załadowane naczynie z membraną rozrywającą umieszczoną do góry przenosi się na miejsce (podstawę), w którym będzie wykonywany zapłon, umieszczone w odpowiednim opancerzonym wyciągu lub komorze do spalania. Końcówki zasilania powinny zostać podłączone do zewnętrznych końcówek głowiczki zapalającej i powinien zostać włączony prąd o natężeniu 10 A. Czas pomiędzy początkiem mieszania i włączeniem zasilania nie powinien przekraczać 10 minut.

Sygnał wytwarzany przez czujnik ciśnienia rejestruje się przez odpowiedni układ, który umożliwia ocenę i rejestrowanie stałego zapisu czasu narastania ciśnienia (np. przekaźnik połączenia jest z rejestratorem). Mieszaninę ogrzewa się aż do pęknięcia membrany rozrywającej lub przez co najmniej 60 s. Jeżeli membrana rozrywająca nie pękła, to mieszaninę nale-

<sup>7</sup> Mieszaniny utleniaacza z celulozą powinny być traktowane jako potencjalnie wybuchowe i wszelkie czynności powinny być wykonywane ostrożnie.

<sup>8</sup> W praktyce, może to być uzyskiwane poprzez przygotowanie mieszaniny 1:1 (masowo) mieszaniny cieczy badanej i celulozy w ilości większej niż potrzebna do próby i do przeniesienia  $5 \pm 0,1$ g do naczynia ciśnieniowego. Do każdej próby mieszanina powinna być świeżo przygotowana.

<sup>9</sup> W szczególności nie należy dopuścić do kontaktu pomiędzy sąsiadującymi zwojami spirali.

ży pozostawić do ochłodzenia przed ostrożnym rozebraniem urządzenia, stosując zabezpieczenia przed działaniem nadciśnienia, które może w nim występować. Wykonuje się pięć prób z cieczą badaną i substancja(ami) kontrolną(y)mi). Zapisuje się czas narastania ciśnienia od 690 kPa do 2070 kPa powyżej ciśnienia atmosferycznego. Potem oblicza się średni czas narastania ciśnienia.

W pewnych przypadkach ciecze mogą powodować wzrost ciśnienia (zbyt wysoki lub zbyt niski), spowodowany przez reakcje chemiczne niebędące charakterystycznymi dla właściwości utleniających. W takich przypadkach może być konieczne powtórzenie badania z materiałem obojętnym, np. diatomitem (ziemią okrzemkową), zastępującym celulozę w celu wyjaśnienia rodzaju reakcji.

## 2. WYNIKI

Czas narastania ciśnienia zarówno dla substancji badanej i substancji kontrolnej(ych). Czas narastania ciśnienia z badań z materiałem obojętnym, o ile zostały przeprowadzone.

### 2.1. Opracowanie wyników

Oblicza się średni czas narastania ciśnienia dla cieczy badanej i substancji kontrolnej(ych).

Oblicza się średni czas narastania ciśnienia z badań z materiałem obojętnym (o ile zostały przeprowadzone).

Niektóre przykłady wyników podano w tabeli A.21.1.

Tabela A.21.1.

#### Przykłady wyników<sup>d)</sup>

Ciecz <sup>c)</sup>	Średni czas narastania ciśnienia dla cieczy badanej zmieszanej w stosunku 1:1 (masowo) z celulożą (ms)
Dichromian amonu, nasycony roztwór wodny	20800
Azotan wapnia, nasycony roztwór wodny	6700
Azotan żelazowy, nasycony roztwór wodny	4133
Nadchloran litu, nasycony roztwór wodny	1686
Nadchloran magnezu, nasycony roztwór wodny	777
Azotan nikławy, nasycony roztwór wodny	6250
Kwas azotowy, 65 %	4767 <sup>a)</sup>
Kwas nadchlorowy, 50 %	121 <sup>a)</sup>
Kwas nadchlorowy, 55 %	59
Azotan potasu, 30 % roztwór wodny	26690
Azotan srebra, nasycony roztwór wodny	— <sup>b)</sup>
Chloran sodu, 40 % roztwór wodny	2555 <sup>a)</sup>
Azotan sodu, 45 % roztwór wodny	4133
Substancja obojętna Woda: celuloza	— <sup>b)</sup>

a) Średnia wartość z porównawczych prób międzylaboratoryjnych.

b) Maksymalnego ciśnienia 2070 kPa nie uzyskano.

c) Roztwory nasycone powinny być przygotowywane w 20 °C.

d) Zobacz pozycja 1 piśmiennictwa dotycząca klasyfikacji według algorytmu ONZ dla transportu.

## 3. SPRAWOZDANIE

### 3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje:

- identyfikację, skład, czystość badanej substancji itp.,
- stężenie substancji badanej,
- zastosowaną procedurę suszenia celulozy,
- zawartość wody w wysuszonej celulozie,
- wyniki badań,
- wyniki badań z materiałem obojętnym, jeżeli były wykonywane,

- obliczone średnie czasy narastania ciśnienia,
- odstępstwa od niniejszej metody i ich przyczyny,
- wszystkie informacje dodatkowe lub uwagi dotyczące interpretacji wyników.

### 3.2. Interpretacja wyników<sup>10)</sup>

Wyniki badań ocenia się na podstawie:

- obserwacji, czy mieszanina cieczy badanej i celulozy zapala się samorzutnie, oraz

<sup>10)</sup> Zobacz pozycja 1 piśmiennictwa; w celu interpretacji wyników na podstawie zaleceń ONZ dla transportu stosowanych dla różnych substancji kontrolnych.

— porównania średniego czasu przyjętego dla narastania ciśnienia od 690 kPa do 2070 kPa z substancją(ami) kontrolną(yami).

Ciecz uważa się za utleniającą, jeżeli:

— mieszanina 1:1 (masowo), cieczy i celulozy zapala się samorzutnie lub

— mieszanina 1:1 (masowo) cieczy i celulozy wykazuje średni czas narastania ciśnienia mniejszy lub równy średniemu czasowi narastania ciśnienia dla mieszaniny 1:1 masowo, 65 % (masowo) wodnego roztworu kwasu azotowego i celulozy.

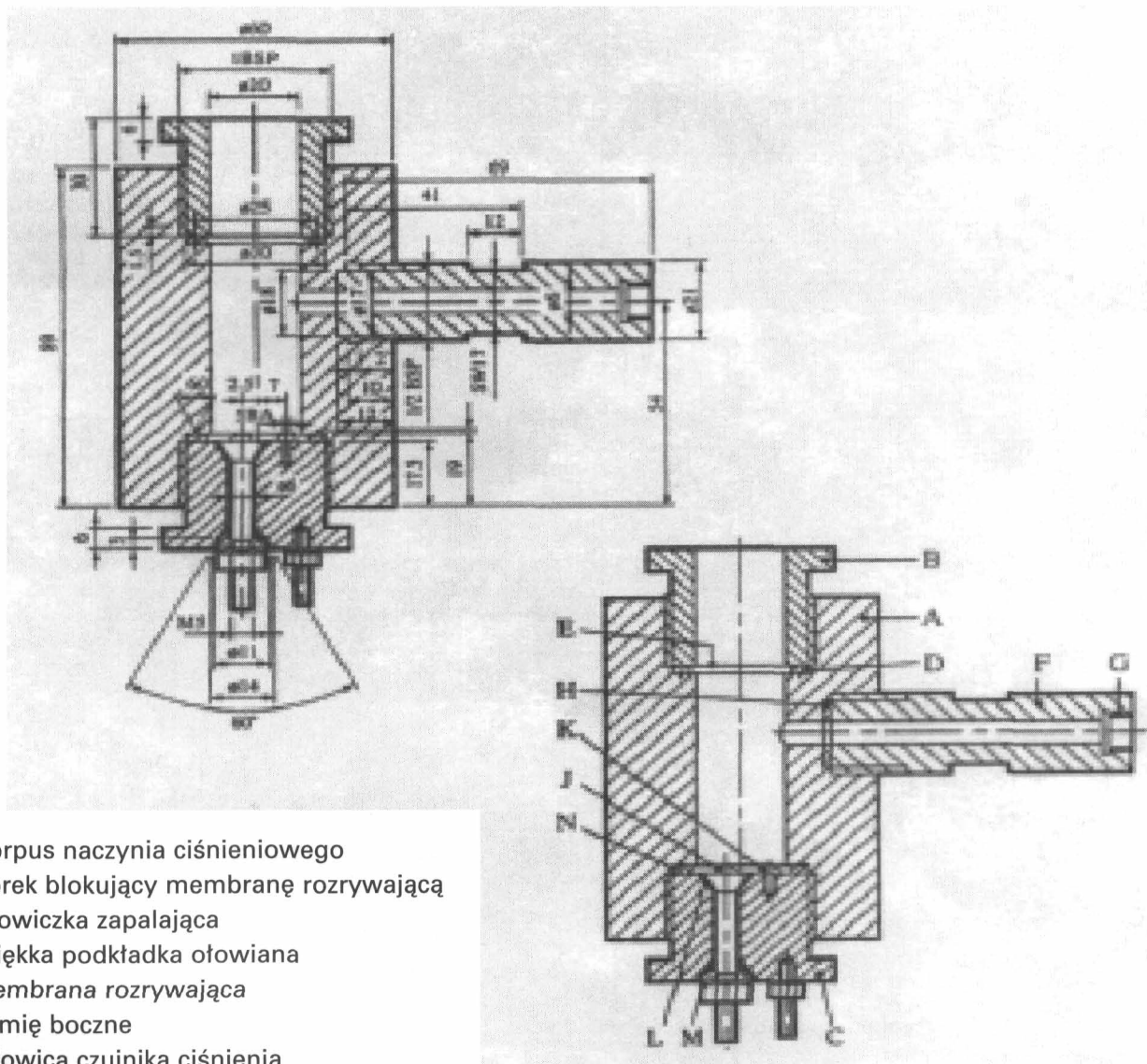
W celu uniknięcia fałszywie pozytywnych wyników, jeżeli to konieczne, powinny być również uwzględnione przy ich interpretacji wyniki uzyskane podczas badania cieczy z materiałem obojętnym.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Rysunek A.21.1.

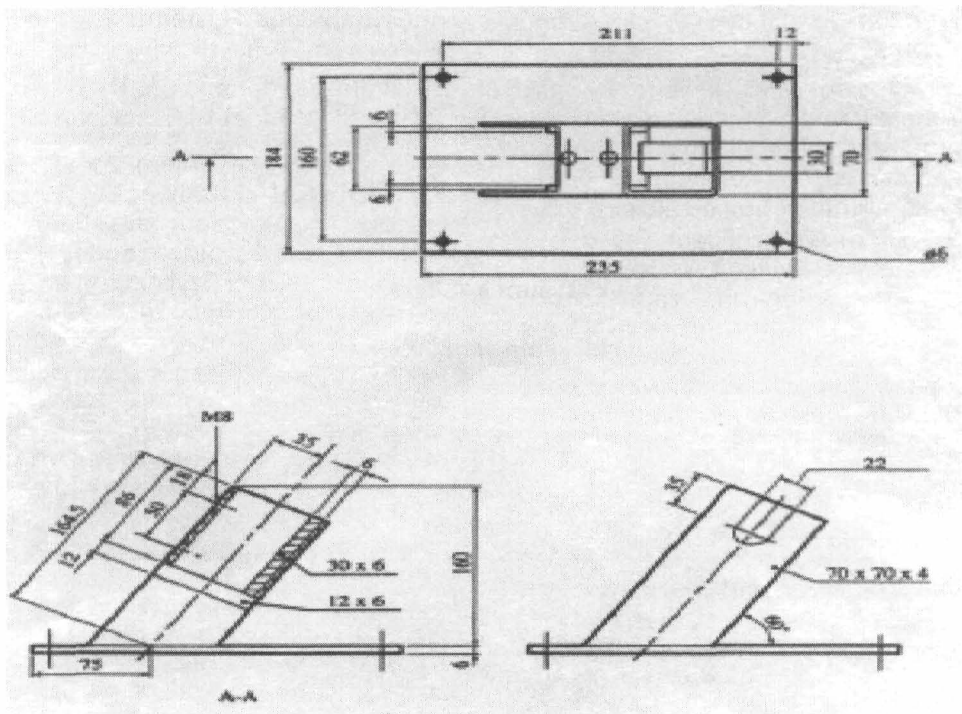
#### Naczynie ciśnieniowe



- A Korpus naczynia ciśnieniowego
- B Korek blokujący membranę rozrywającą
- C Głowiczka zapalająca
- D Mięka podkładka ołowiana
- E Membrana rozrywająca
- F Ramię boczne
- G Głowica czujnika ciśnienia
- H Podkładka
- J Elektroda zaizolowana
- K Elektroda uziemiona
- L Izolacja
- M Króciec stalowy
- N Wyżłobienie na odkształcenie podkładki

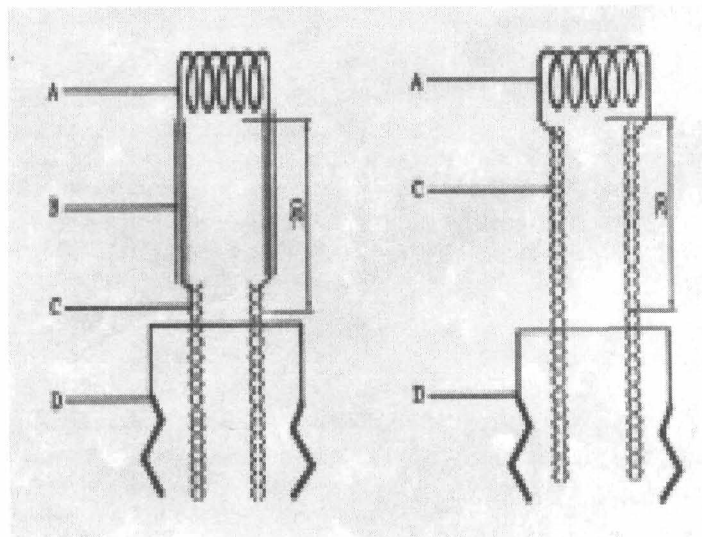
Rysunek A.21.2.

## Urządzenie podtrzymujące



Rysunek A.21.3.

## Układ zapalający



- A Spirala zapalająca
- B Izolacja
- C Elektrody
- D Głowiczka zapalająca

Uwaga: mogą być stosowane oba te ustawienia.

**B.1.BIS. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (PODANIE DROGĄ POKARMOWĄ) — METODA USTALONEJ DAWKI****1. METODA**

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD Nr 420 (2001).

**1.1. Wstęp**

W tradycyjnych metodach szacowania ostrej toksyczności poszukiwanym wskaźnikiem siły działania toksycznego jest padnięcie zwierząt. W 1984 r. Brytyjskie Towarzystwo Toksykologiczne zaproponowało nowe podejście do badań toksyczności ostrej opierające się na kolejnym podawaniu dawek o ustalonej wielkości (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Podejście to umożliwia uniknięcie traktowania padnięcia zwierząt jako kryterium oceny, gdyż polega na obserwacji wyraźnych cech działania toksycznego ujawniających się po kolejnym podaniu dawki o ustalonej wielkości. Po brytyjskich (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa) i międzynarodowych (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa) badaniach walidacyjnych przeprowadzonych *in vivo* procedura została przyjęta w 1992 r. jako metoda badawcza. Następnie w kolejnych badaniach (zobacz pozycje 4, 5 i 6 piśmiennictwa) oszacowano wiarygodność Metody Ustalonej Dawki przy zastosowaniu statystycznych modeli matematycznych. Badania *in vivo* oraz matematyczne modelowania wykazały, że procedura jest powtarzalna, w porównaniu z metodami tradycyjnymi umożliwia zmniejszenie liczby stosowanych zwierząt oraz pozwala uszeregować substancje w sposób zbliżony do innych nietradycyjnych metod badania toksyczności ostrej.

Wytyczne co do wyboru najbardziej właściwej metody badawczej do oceny toksyczności ostrej podane są w Wytycznych do Badań Toksyczności Ostrej po Podaniu Drogą Pokarmową (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Dokument ten zawiera także dodatkowe informacje, dotyczące przeprowadzenia badań Metodą B.1.bis i ich interpretacji.

Zasadą metody jest, aby w badaniu głównym stosowane były tylko średnio toksyczne dawki; unikać należy podawania dawek, które prawdopodobnie będą powodować padnięcie zwierząt. Nie należy podawać również substancji w dawkach, co do których jest pewność, że powodują znaczny ból i cierpienie z powodu ich ostrego działania drażniącego lub żrącego. Zwierzęta w agonii lub w widoczny sposób cierpiące, bądź też wykazujące oznaki silnego i trwałego bólu, powinny być w sposób humanitarny uśmiercone, a w interpretacji wyników powinny zostać traktowane tak samo, jak zwierzęta, które padły podczas badania. Kryteria podjęcia decyzji o uśmierceniu zwierząt w agonii lub cierpiących oraz wytyczne co do rozpoznawania przewidywanej lub nieuchronnej śmierci są przedmiotem osobnych Wytycznych (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa).

Stosując tę metodę, można uzyskać informacje na temat niebezpiecznych właściwości substancji oraz uszeregować je i sklasyfikować zgodnie z zasada-

mi Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) dotyczącymi klasyfikacji substancji chemicznych ze względu na toksyczność ostrą (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

Przed przystąpieniem do badania wykonujący je powinien wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji. Do takich informacji zalicza się tożsamość i budowę chemiczną substancji, jej właściwości fizykochemiczne, wyniki innych badań toksykologicznych *in vitro* lub *in vivo*, dane toksykologiczne dla substancji o podobnej budowie chemicznej oraz przewidywane zastosowanie(a) tej substancji. Takie informacje są konieczne w celu przekonania wszystkich zainteresowanych, że badanie jest odpowiednie dla ochrony zdrowia ludzkiego i odpowiednie do właściwego wyboru dawki początkowej.

**1.2. Definicje**

**Toksyczność ostra po podaniu drogą pokarmową:** oznacza wszystkie szkodliwe skutki, które występują po podaniu substancji drogą pokarmową w pojedynczej dawce lub w wielu dawkach, podanych w czasie 24 godzin.

**Padnięcie opóźnione:** oznacza, że zwierzę nie pada lub nie znajduje się w stanie agonii w czasie 48 godzin od podania badanej substancji, ale pada później, w czasie 14-dniowego okresu obserwacji.

**Dawka:** jest ilością badanej substancji podanej zwierzęciu. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji przypadającą na jednostkę masy ciała zwierzęcia (np.: mg/kg).

**Toksyczność widoczna:** jest ogólnym pojęciem opisującym wyraźne oznaki zatrucia występujące po podaniu badanej substancji (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa) takie, że w następnej najwyższej ustalonej dawce mogą wystąpić trwałe objawy ostrego bólu i cierpienia, stan agonii (kryteria podano w Humane Endpoints Guidance Document (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa) lub prawdopodobne jest padnięcie większości zwierząt.

**GHS:** Światowy System Zharmonizowany. Wspólne przedsięwzięcie OECD (zdrowie i środowisko), Komitetu Ekspertów ONZ ds. Transportu Towarów Niebezpiecznych (właściwości fizykochemiczne), ILO (informacja o zagrożeniach) i koordynowane przez Międzynarodowy Program Zarządzania Chemikaliami (IOMC).

**Nieuchronne padnięcie:** oznacza spodziewany stan agonii lub padnięcie po przedłużeniu czasu obserwacji. Do objawów mogących wskazywać na taki stan u gryzoni zalicza się konwulsje, położenie boczne, pozycję leżącą i drgawki (bardziej szczegółowy opis można znaleźć w Humane Endpoints Guidance Document, zobacz pozycja 8 piśmiennictwa).

**LD<sub>50</sub> (medialna dawka śmiertelna):** jest statystycznie obliczoną pojedynczą dawką substancji, która spowoduje śmierć 50 % zwierząt po podaniu drogą pokarmową. Wartość LD<sub>50</sub> jest wyrażana w postaci masy badanej substancji przypadającej na jednostkę masy badanego zwierzęcia (mg/kg).

**Dawka graniczna:** odnosi się do górnego ograniczenia dawki w badaniu (2000 lub 5000 mg/kg).

**Prognozowane padnięcie:** występowanie objawów klinicznych świadczących o padnięciu w przewidywalnym okresie w przyszłości przed upływem zakończenia doświadczenia, np. niezdolność do picia wody lub spożywania paszy (bardziej szczegółowy opis można znaleźć w Humane Endpoints Guidance Document, zobacz pozycja 8 piśmiennictwa).

### 1.3. Zasada metody badawczej

Grupy zwierząt jednej płci narażane są według procedury etapowej przy zastosowaniu ustalonych dawek 5, 50, 300 i 2000 mg/kg (wyjątkowo może być brana pod uwagę dodatkowa dawka 5000 mg/kg, zobacz pkt 1.6.2). Poziom dawki początkowej jest wybierany na podstawie badania wstępnego i jest to dawka, która powinna powodować wystąpienie pewnych objawów toksyczności, jednak bez wystąpienia jej ostrych skutków lub śmiertelności. Objawy kliniczne i warunki powiązane z wystąpieniem bólu, cierpienia i nieuchronnego padnięcia są szczegółowo opisane w oddzielnych Wytycznych OECD (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Następne grupy zwierząt mogą być narażane na badaną substancję podawaną w wyższych lub niższych ustalonych dawkach, w zależności od występowania lub niewystępowania objawów toksyczności lub śmiertelności. Procedura ta jest kontynuowana aż do podania substancji w dawce powodującej widoczne objawy toksyczności lub do momentu, gdy stwierdzi się nie więcej niż jeden przypadek padnięcia lub gdy w najwyższej dawce nie notuje się żadnych skutków, bądź też padnięcie występuje w dawce najniższej.

### 1.4. Opis metody badawczej

#### 1.4.1. Wybór gatunku zwierząt

Zalecanym gatunkiem gryzoni jest szczur, chociaż mogą być również stosowane inne gatunki gryzoni. W badaniach zazwyczaj używa się samic (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Jest to uzasadnione opisanymi w literaturze wynikami konwencjonalnych badań służących do określenia wartości LD<sub>50</sub>, które wykazują, że zazwyczaj istnieje niewielka różnica we wrażliwości pomiędzy samcami a samicami gryzoni; a w tych przypadkach, w których obserwowane są różnice, samice są na ogół nieco bardziej wrażliwe (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa). Jeżeli wiedza o toksykologicznych lub toksykokinetycznych właściwościach strukturalnie podobnych substancji wskazuje na większe prawdopodobieństwo, że samce mogą być bardziej wrażliwe, wówczas do badań powinny być użyte szczury tej płci. Gdy badanie prowadzi się na samcach, należy podać wyraźne uzasadnienie.

Stosowane powinny być młode, dojrzałe, zdrowe osobniki powszechnie używanych ras laboratoryjnych. Samice powinny być dziewicze i nieciążarne. Każde zwierzę na początku doświadczenia powinno być w wieku 8 do 12 tygodni, a jego masa powinna zawierać się w przedziale  $\pm 20$  % średniej masy uprzednio narażanych zwierząt.

#### 1.4.2. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50–60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody. Zwierzęta mogą być pogrupowane w klatkach wg otrzymywanej dawki, ale liczba zwierząt przypadających na klatkę nie może zakłócać dokładnych obserwacji każdego zwierzęcia.

#### 1.4.3. Przygotowanie zwierząt

Zwierzęta są wybierane losowo, znakowane dla umożliwienia identyfikacji każdego osobnika i w celu aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych przetrzymywane w klatkach przynajmniej 5 dni przed rozpoczęciem podawania substancji.

#### 1.4.4. Przygotowanie określonych dawek substancji i ich podawanie

Zasadniczo substancje badane, niezależnie od dawki, powinny być podawane w stałej objętości poprzez zróżnicowanie stężenia podawanego preparatu. Gdy bada się produkt końcowy w postaci ciekłej lub mieszaninę, wówczas zastosowanie nierozcieńczonej badanej substancji, tj. w stałym stężeniu, może być bardziej odpowiednie i wymagane przez niektóre urzędy dla następującej w dalszej kolejności oceny ryzyka tej substancji. W każdym z tych przypadków nie należy przekraczać maksymalnej objętości podawanej dawki. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana jednorazowo, zależy od rozmiarów zwierzęcia. U gryzoni objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, jednakże w przypadku roztworów wodnych można wziąć pod uwagę objętość 2 ml/100 g masy ciała. O ile jest to tylko możliwe, to w przypadku różnych postaci (formulacji) podawanego preparatu zaleca się w pierwszej kolejności użycie wodnych roztworów/zawiesin/emulsji, a w następnej kolejności wskazane są roztwory/zawiesiny/emulsje w oleju (np.: oleju kukurydzianym), a w ostateczności roztwory w innych rozpuszczalnikach. Powinny być znane własności toksykologiczne nośników innych niż woda.

Podawane roztwory muszą być przygotowane na krótko przed ich podaniem, chyba że stabilność preparatu w okresie dłuższym od okresu, w jakim przeprowadzono badanie, jest znana i akceptowalna.



## 1.5. Sposób postępowania

### 1.5.1. Podawanie substancji

Badana substancja jest podawana jednorazowo w pojedynczej dawce za pomocą sondy dożołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. W przypadku gdy jednorazowe podanie całej dawki jest niemożliwe, może być ona podana w porcjach, przy czym czas podania całej dawki nie może przekroczyć 24 godzin.

Zwierzęta przed podaniem badanej substancji powinny być głodzone (np. w przypadku szczurów pozostawia się wodę, ale paszy nie podaje się w nocy; w przypadku myszy pozostawia się wodę, a paszy nie podaje się w okresie 3—4 godzin przed doświadczeniem). Po okresie głodzenia należy zwierzęta zważyć i podać im badaną substancję. Po podaniu substancji, w przypadku szczurów, paszę podaje się po upływie 3—4 godzin, a w przypadku myszy po upływie 1—2 godzin. Jeżeli substancję podaje się w porcjach w ciągu pewnego okresu, wówczas w zależności od długości trwania tego okresu może okazać się konieczne dostarczenie zwierzętom wody i paszy.

### 1.5.2. Badanie wstępne

Celem badania wstępnego jest ustalenie właściwej dawki początkowej stosowanej w badaniu właściwym. Badana substancja jest podawana pojedynczym zwierzętom w sposób sekwencyjny według schematów zamieszczonych w Schemacie 1. Badanie wstępne kończy się, gdy można podjąć decyzję co do wyboru dawki początkowej stosowanej w badaniu właściwym lub gdy w najniższej ustalonej dawce obserwuje się padnięcie badanych zwierząt.

Dawka początkowa do badania wstępnego jest wybierana z ustalonych poziomów 5, 50, 300 i 2000 mg/kg jako dawka mająca spowodować widoczną toksyczność, jeśli można to przewidzieć na podstawie wyników badań *in vivo* i *in vitro* tej samej substancji lub substancji podobnej strukturalnie. W przypadku braku takich informacji dawką początkową będzie 300 mg/kg.

Pomiędzy narażaniem kolejnych zwierząt powinien być zachowany odstęp wynoszący przynajmniej 24 godziny. Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane przez przynajmniej 14 dni.

W wyjątkowych sytuacjach, usprawiedliwionych tylko szczególnymi wymaganiami prawnymi, można rozważyć zastosowanie dodatkowej, wyższej dawki 5000 mg/kg (Kryteria Klasyfikacji). W celu zapobieżenia nadmiernym cierpieniom zwierząt nie jest zalecane badanie w zakresach Kategorii 5 wg GHS (dawki 2000 do 5000 mg/kg). Powinno być ono brane pod uwagę tylko wtedy, gdy istnieje duże prawdopodobieństwo, że wyniki takiego badania będą miały istotne znaczenie dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt.

W przypadkach gdy badane zwierzę narażone w badaniu wstępnym na substancję w najniższej ustalonej dawce (5 mg/kg) padnie, wskazaną procedurą

jest zakończenie badań i przypisanie substancji do Kategorii 1 wg GHS (jak przedstawiono w Schemacie 1). Jeżeli wymagane jest dalsze potwierdzenie tej klasyfikacji, można przeprowadzić dodatkową procedurę, narażając drugie zwierzę w dawce 5 mg/kg. Jeżeli i to zwierzę padnie, wówczas potwierdza się zaklasyfikowanie substancji do Kategorii 1 wg GHS i natychmiast kończy badanie. Jeżeli drugie zwierzę przeżyje, wówczas narażane są maksymalnie trzy dodatkowe zwierzęta w dawce 5 mg/kg. Ze względu na wysokie ryzyko śmiertelności, w celu zapobieżenia zbędnym cierpieniom, zwierzęta powinny być narażane jedno po drugim. Odstęp czasowy pomiędzy podawaniem substancji w kolejnych dawkach powinien być wystarczający do ustalenia, czy poprzednie zwierzę może przeżyć. Jeżeli padnie drugie zwierzę, natychmiast wstrzymuje się podawanie substancji w kolejnych dawkach, a badanie się kończy. Wystąpienie przypadku drugiego padnięcia (bez względu na liczbę zwierząt pozostałych przy życiu w momencie zakończenia badania) powoduje zaklasyfikowanie substancji do wyniku A (2 lub więcej padnięć), przestrzegana jest zasada klasyfikacji wg Schematu 2 w ustalonej dawce 5 mg/kg (Kategoria 1 — jeżeli wystąpiły 2 lub więcej przypadki padnięć lub Kategoria 2 — jeżeli nie wystąpił więcej niż 1 przypadek padnięcia). Ponadto Schemat 3 przedstawia wytyczne co do klasyfikacji według systemu UE obowiązującego do czasu wdrożenia systemu GHS.

### 1.5.3. Badanie właściwe

#### 1.5.3.1. Liczba zwierząt i poziomy dawek

Działania, które należy podjąć po badaniu wstępnym, podane są w Schemacie 2. Konieczne będzie dokonanie wyboru jednej z trzech możliwości: zaprzestanie badań i przypisanie substancji do odpowiedniej klasy zagrożenia, badanie w wyższej ustalonej dawce lub badanie w niższej ustalonej dawce. Jednakże w celu oszczędzenia cierpienia zwierzętom dawka powodująca padnięcia w badaniu wstępnym nie może być powtarzana w badaniu właściwym (zobacz Schemat 2). Doświadczenie wykazuje, że najbardziej prawdopodobnym wynikiem badania substancji w dawce początkowej będzie możliwość sklasyfikowania jej i dalsze doświadczenia nie będą konieczne.

Dla każdej badanej dawki należy użyć pięciu zwierząt jednej płci. Wśród tych pięciu zwierząt powinno znajdować się jedno zwierzę, któremu podawana była substancja w odpowiednio ustalonej dawce w trakcie badania wstępnego, oraz cztery dodatkowe zwierzęta (z wyjątkiem sytuacji, gdy dawka stosowana w badaniu głównym nie była stosowana w badaniu wstępnym).

Odstęp czasowy pomiędzy podawaniem substancji w kolejnych dawkach jest określony przez pojawienie się, czas trwania i nasilenie objawów toksyczności. Badanie zwierząt poprzez narażanie na substancję w kolejnej dawce powinno być wstrzymane do czasu uzyskania pewności co do przeżycia uprzednio narażonych zwierząt. Zalecany jest okres przerwy trwający 3 do 4 dni pomiędzy podawaniem substancji w kolej-

nych dawkach, aby umożliwić zaobserwowanie objawów opóźnionej toksyczności. Odstęp czasowy powinien być właściwie dostosowany np. w przypadku niedających się wyjaśnić reakcji.

Gdy pod uwagę bierze się zastosowanie najwyższej ustalonej dawki 5000 mg/kg, to powinna być stosowana procedura podana w Kryteriach Klasyfikacji (zobacz także pkt 1.6.2.).

#### 1.5.3.2. *Badanie dawki granicznej*

Badanie dawek granicznych wykonywane jest w sytuacjach, gdy osoba przeprowadzająca doświadczenie posiada informacje, że badany materiał jest prawdopodobnie nietoksyczny, tj. gdy przejawia on objawy toksyczności w dawkach powyżej górnych, wymaganych przez prawo poziomów. Informacje o toksyczności badanego materiału mogą pochodzić z badań podobnych związków lub podobnych zarówno pod względem tożsamości składników, jak i składu procentowego produktów. W przypadku braku informacji o toksyczności bądź też przypuszczeń, że badany materiał jest toksyczny, należy przeprowadzić badanie właściwe.

Stosując typową procedurę do badania wstępnego z zastosowaniem dawki początkowej 2000 mg/kg (lub wyjątkowo 5000 mg/kg) i następnie badanie z wykorzystaniem czterech zwierząt narażanych na substancję w dawce na tym samym poziomie, spełnia się wymagania badania dawki granicznej zgodne z opisaną procedurą.

### 1.6. Obserwacje

Obserwacje należy prowadzić dla każdego pojedynczego zwierzęcia, przynajmniej raz podczas pierwszych 30 minut po podaniu badanej substancji i okresowo podczas pierwszych 24 godzin, ze zwróceniem szczególnej uwagi podczas pierwszych 4 godzin. Obserwację zwierząt należy przeprowadzić codziennie przez 14 dni, z wyjątkiem przypadków, gdy muszą być one usuwane z badania i w sposób humanitarny uśmiercane lub gdy są martwe. Okres obserwacji nie powinien być jednak ustalony sztywno. Powinien być określony przez objawy toksyczne, czas ich rozpoczęcia i długość okresu powrotu do stanu normalnego i dlatego, gdy uzna się to za konieczne, może być odpowiednio wydłużony. Okresy pojawiania się i znikania objawów toksyczności są ważne, szczególnie w przypadku istnienia tendencji do wystąpienia opóźnienia objawów toksyczności (zobacz pozycja 11 piśmiennictwa). Wszystkie obserwacje należy systematycznie zapisywać, prowadząc dla każdego zwierzęcia osobne zapisy.

Dodatkowe obserwacje będą konieczne, gdy zwierzęta nadal przejawiają objawy toksyczności. Należy obserwować zmiany na skórze i sierści, oczach i błonach śluzowych, a także w układzie oddechowym, układzie krążenia, ośrodkowym i autonomicznym układzie nerwowym oraz w aktywności somatomotorycznej i zachowaniu. Uwagę należy zwrócić na pojawienie się drgawek, konwulsji, ślinotoku, biegunki, le-

targu, snu i śpiączki. Pod uwagę należy brać zasady i kryteria podane w Humane Endpoints Guidance Document (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Zwierzęta w agonii i wykazujące objawy silnego cierpienia lub bólu powinny być w sposób humanitarny uśmiercane. Dla zwierząt uśmiercanych lub martwych należy możliwie dokładnie zanotować czas padnięcia.

#### 1.6.1. Masa ciała

Masy ciała poszczególnych osobników powinny być określone na krótko przed rozpoczęciem podawania badanej substancji i następnie powinny być określone przynajmniej raz w tygodniu. Zmiany masy ciała powinny być obliczone i zapisywane. Pod koniec badania zwierzęta, które przeżyły, należy ponownie zważyć i następnie w sposób humanitarny je uśmiercić.

#### 1.6.2. Badania patologiczne

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane badaniom makroskopowym podczas sekcji (także te, które padną podczas badania lub są uśmiercane z powodów humanitarnych). Należy zanotować wszystkie zmiany patologiczne, które wystąpiły u każdego zwierzęcia. Należy wziąć pod uwagę badania mikroskopowe narządów wykazujących zmiany patologiczne u zwierząt przeżywających 24 lub więcej godzin od początku podawania badanej substancji, ponieważ mogą one dostarczyć użytecznych informacji.

## 2. WYNIKI

Należy dostarczyć dane pochodzące od każdego zwierzęcia indywidualnie. Dodatkowo wszystkie dane powinny być zebrane w formie tabeli przedstawiającej dla każdej badanej grupy: liczbę użytych zwierząt, liczbę zwierząt przejawiających objawy toksyczności, liczbę zwierząt martwych i uśmierconych podczas badania, czas padnięcia poszczególnych zwierząt, opis i czas wystąpienia objawów toksyczności i odwracalności reakcji oraz wyniki sekcji.

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- stan skupienia, czystość, gdy ma to znaczenie, także właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne, w tym numer CAS.

Nośnik (jeśli jego użycie było konieczne):

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli nie była nim woda.

Badane zwierzęta:

- gatunek/szczep,



- stan mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany,
- liczba, wiek i płeć zwierząt (w tym także uzasadnienie zastosowania samców zamiast samic),
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasza itp.

#### Warunki doświadczenia:

- szczegółowe dane dotyczące postaci (formulacji) badanej substancji, w tym stan skupienia podanego materiału,
- szczegółowe dane dotyczące sposobu podawania badanej substancji, w tym podawane objętości i czas podawania,
- szczegółowe dane dotyczące paszy i jakości wody, w tym typ i źródło paszy, źródło wody,
- podstawy wyboru dawki początkowej.

#### Wyniki:

- ujęte w tabeli dane dla każdego zwierzęcia i poziomu dawki (tj. zwierzęta wykazujące objawy toksyczności łącznie ze śmiertelnością, nasilenie i czas trwania objawów),
- ujęte w tabeli dane dotyczące masy ciała i jej zmian,
- masa ciała poszczególnych zwierząt w dniu podawania badanej substancji i następnie w odstępach tygodniowych oraz w dniu padnięcia bądź uśmiercenia,
- data i czas padnięcia,
- czas pojawienia się objawów toksyczności i informacje, czy były one odwracalne dla każdego zwierzęcia,
- jeśli są dostępne, wyniki sekcji i wyniki badań histopatologicznych każdego zwierzęcia.

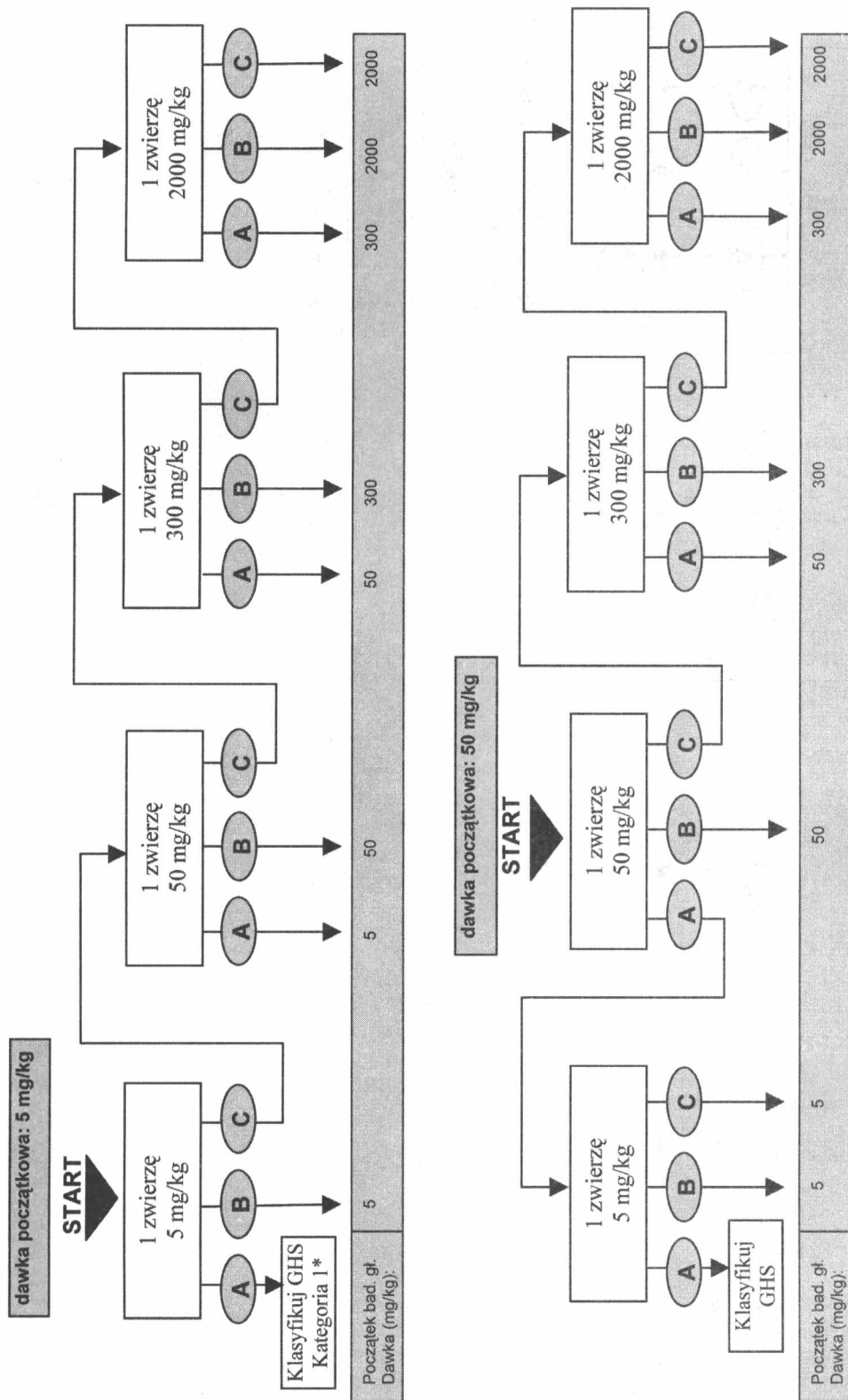
Dyskusja i interpretacja wyników.

Wnioski.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

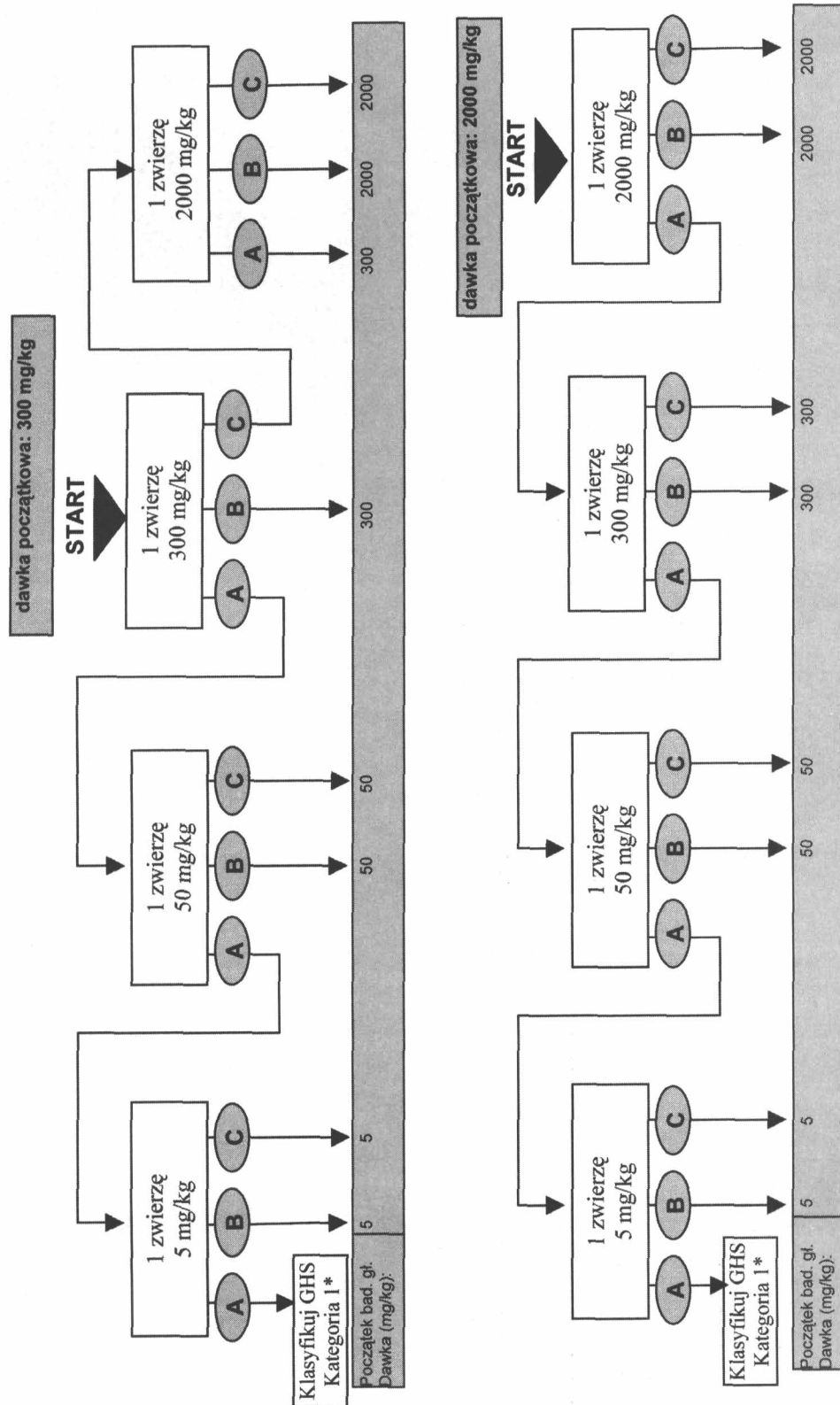
- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85—92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the 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., Kundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of the fixed — dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Fd. Chem. Toxicol.*, 28, 469—482.
- 4) Whithead and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed — dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313—324.
- 5) Stallard and Whitehead, A. (1995). Reducing the numbers in the fixed — dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.*, 14, 315—323.
- 6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed — dose procedure (manuscript in preparation).
- 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 Assessment 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\\_ENdocuments-521-14-no-24-no-0.FF.html](http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0_3380_ENdocuments-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. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

SCHEMAT 1: SCHEMAT BADANIA WSTĘPNEGO



\* dla wyniku **A** w 5 mg/kg istnieje procedura uzupełniająca dla potwierdzenia klasyfikacji GHS: zobacz pkt 1.5.2.

SCHEMAT 1: SCHEMAT BADANIA WSTĘPNEGO

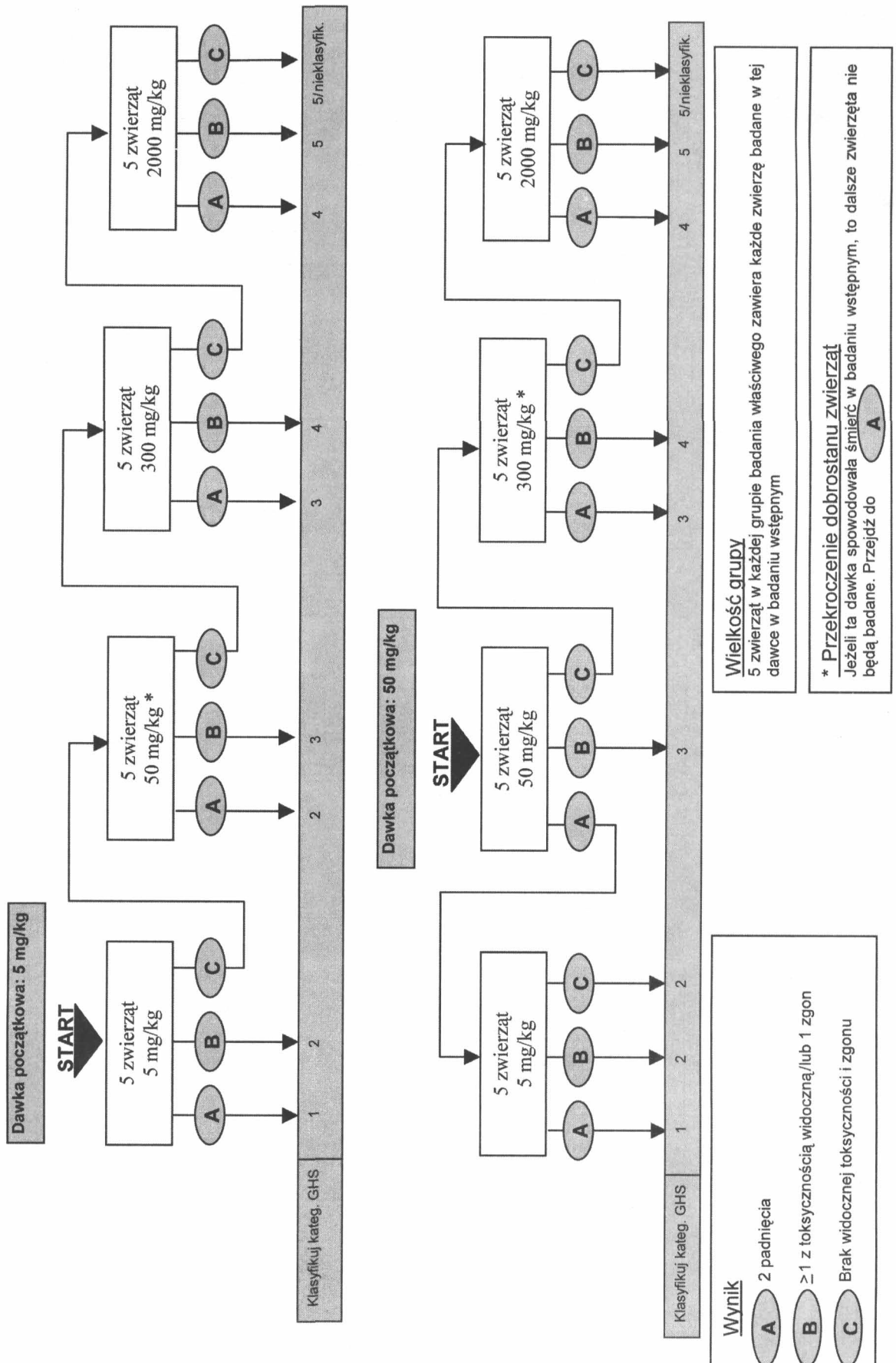


\* dla wyniku **A** w 5 mg/kg istnieje procedura uzupełniająca dla potwierdzenia klasyfikacji GHS: zobacz pkt 1.5.2.

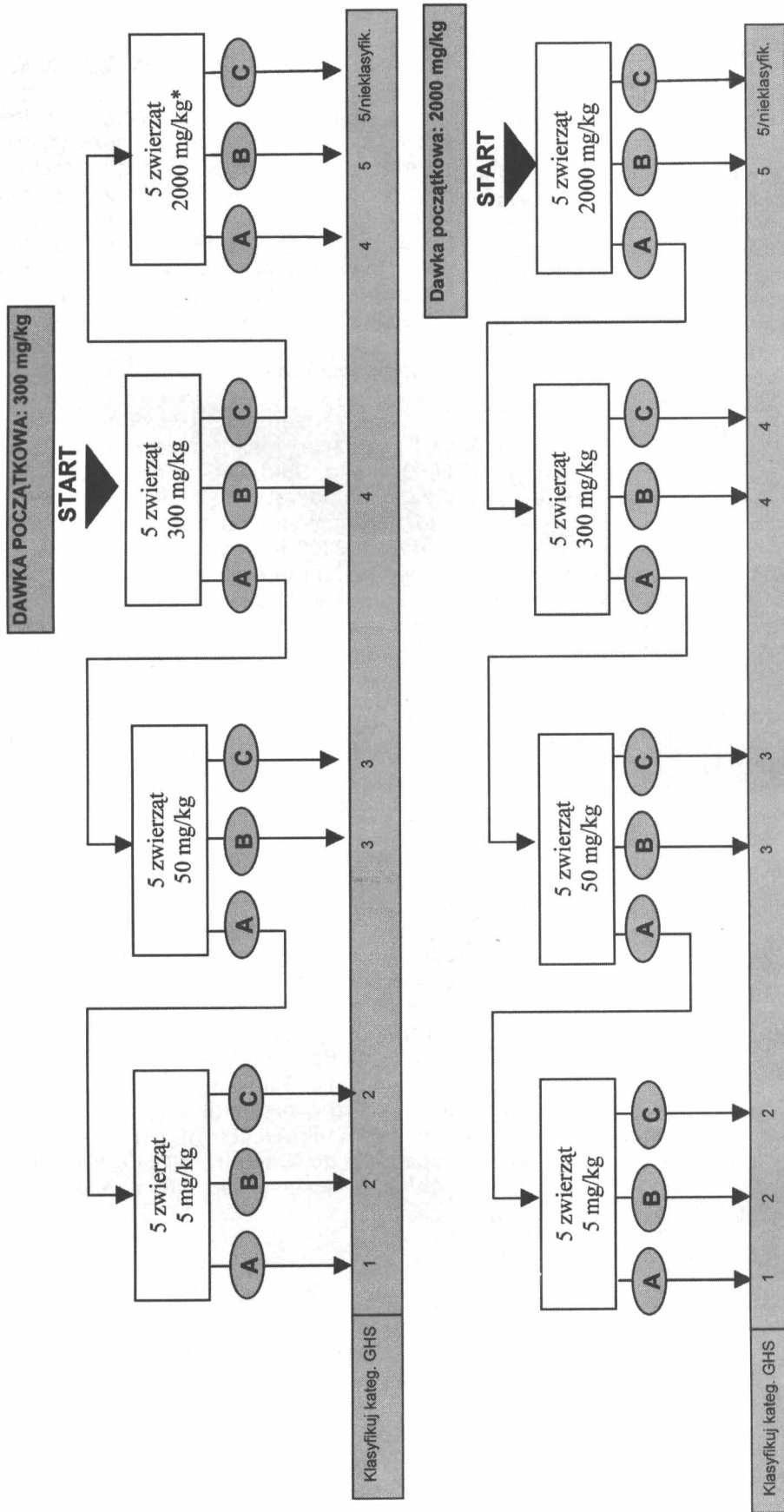
**Wynik**

- A** zgon
- B** toksyczność widoczna
- C** brak widocznej toksyczności i zgonu

SCHEMAT 2: SCHEMAT BADANIA WŁAŚCIWEGO



SCHEMAT 2: SCHEMAT BADANIA WŁAŚCIWEGO



**Wielkość grupy**  
5 zwierząt w każdej grupie badania właściwego zawiera każde zwierzę badane w tej dawce w badaniu wstępnym

\* Przekroczenie dobrostanu zwierząt  
Jeżeli ta dawka spowodowała śmierć w badaniu wstępnym, to dalsze zwierzęta nie będą badane. Przejdź do A

**KRYTERIA KLASYFIKACJI****KRYTERIA KLASYFIKACJI BADANYCH SUBSTANCJI ZE SPODZIEWANYMI WARTOŚCIAMI LD<sub>50</sub> PRZEKRACZAJĄCYMI 2000 mg/kg BEZ POTRZEBY BADANIA**

Kryteria zagrożenia Kategorii 5 są przeznaczone dla identyfikacji substancji o stosunkowo niskiej toksyczności ostrej, które w pewnych okolicznościach mogą stanowić zagrożenie dla wrażliwej populacji. Przewiduje się, że substancje te wykazują wartość LD<sub>50</sub> po podaniu dożołądkowym lub naskórnym w zakresie 2000 do 5000 mg/kg lub równoważne dawki poprzez inne drogi narażenia. Substancje badane mogą być zaklasyfikowane do klasy zagrożenia według klasyfikacji zdefiniowanej przez: 2000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5000 mg/kg (Kategoria 5 w GHS) w następujących przypadkach:

- a) jeżeli skierowane do tej kategorii przez schemat badawczy (Schemat 2) w oparciu o występowanie śmiertelności,
- b) jeżeli istnieją wiarygodne dowody, które wykazują że wartość LD<sub>50</sub> będzie mieściła się w zakresie Kategorii 5; lub inne badania na zwierzętach lub skutki toksyczne u ludzi wskazują ostre działanie na zdrowie ludzkie,
- c) przez ekstrapolację, oszacowanie lub pomiar danych, jeżeli przypisanie do bardziej niebezpiecznej klasy nie jest gwarantowane i:
  - dostępne są wiarygodne informacje wskazujące na znaczące skutki toksyczne u ludzi lub
  - nie obserwuje się śmiertelności podczas badania aż do wartości Kategorii 4 po podaniu drogą pokarmową, lub
  - gdy opinia ekspertów potwierdza znaczące objawy kliniczne toksyczności, podczas badania aż do wartości Kategorii 4, z wyjątkiem biegunki, nastroszenia sierści lub nietypowego wyglądu zewnętrznego, lub
  - gdy opinia ekspertów potwierdza wiarygodne informacje wskazujące potencjał znaczących ostrych objawów w innych badaniach na zwierzętach.

**BADANIE W DAWKACH POWYŻEJ 2000 mg/kg**

W wyjątkowych sytuacjach, uzasadnionych tylko przez szczególne wymagania prawne, pod uwagę brane może być zastosowanie najwyższej ustalonej dawki 5000 mg/kg. Dla dobra zwierząt badanie dawki 5000 mg/kg nie jest zalecane i powinno być stosowane tylko wtedy, gdy istnieje duże prawdopodobieństwo, że wyniki takich badań będą miały bezpośrednie znaczenie dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

**Badanie wstępne**

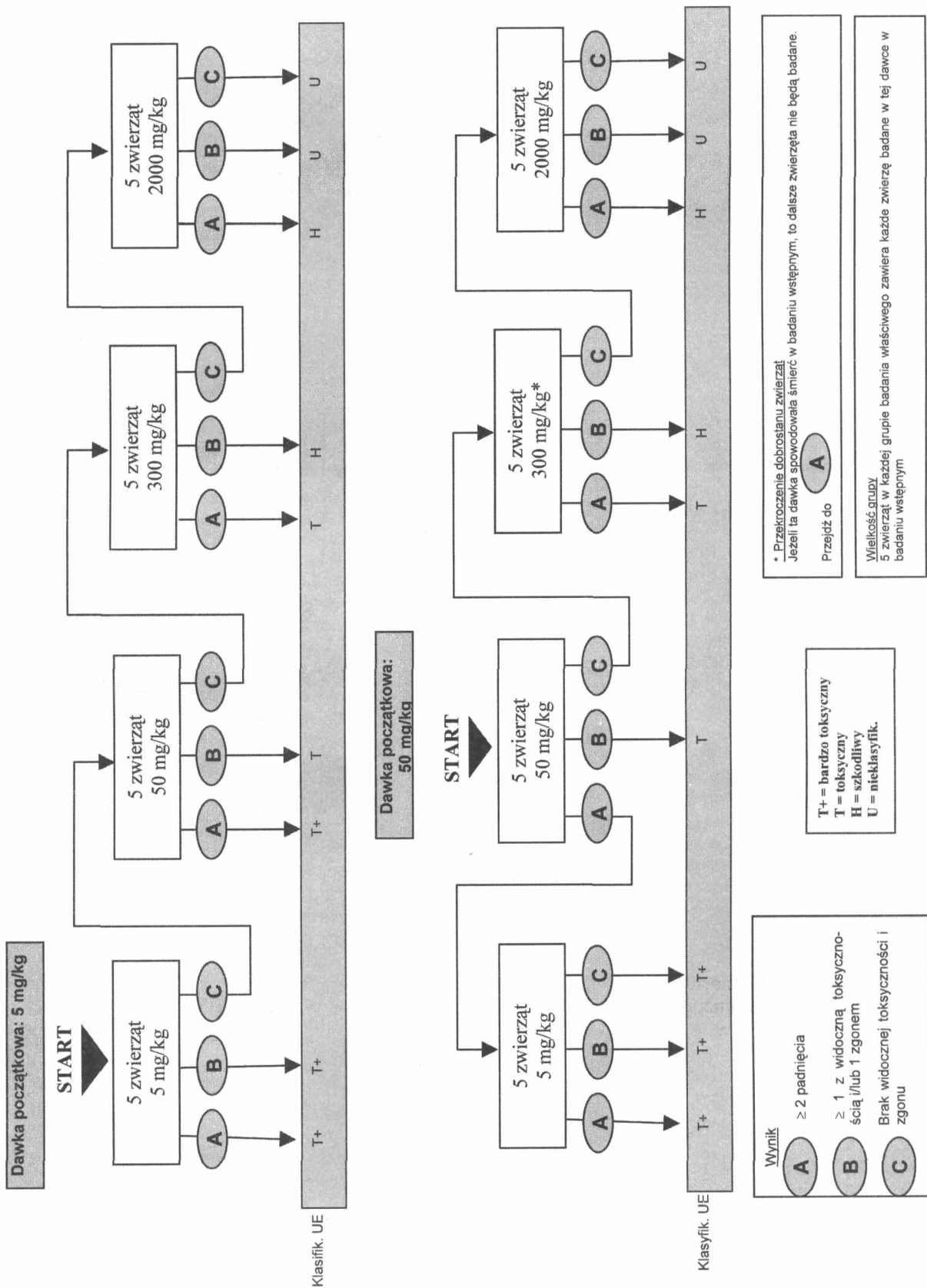
Zasady rządzące procedurą etapową podane w Schemacie 1 są rozszerzone do poziomu dawki 5000 mg/kg. Stąd, jeśli w badaniu wstępnym stosuje się dawkę początkową 5000 mg/kg, to wynik A (padnięcie) będzie wymagał drugiego zwierzęcia do badań w dawce 2000 mg/kg, wyniki B i C (widoczne objawy toksyczności lub brak objawów toksyczności) pozwoli na wybór dawki 5000 mg/kg do badania właściwego. Podobnie, jeśli stosuje się inną dawkę początkową niż 5000 mg/kg, to wtedy badanie podąży do 5000 mg/kg w przypadku wyników B lub C w 2000 mg/kg; wynik A będzie dyktował dawkę 2000 mg/kg do badania właściwego, a wyniki B i C dawkę 5000 mg/kg jako początkową do badania właściwego.

**Badania właściwe**

Zasady rządzące procedurą etapową podane w Schemacie 2 są rozszerzone do poziomu dawki 5000 mg/kg. Stąd, jeśli w badaniu wstępnym stosuje się dawkę początkową 5000 mg/kg, to wynik A ( $\geq 2$  padnięcia) będzie wymagał drugiej grupy do badań w dawce 2000 mg/kg; wynik B (toksyczność widoczna i/lub  $\leq 1$  padnięcie) lub C (brak objawów działania toksycznego) spowoduje brak klasyfikacji substancji według GHS. Podobnie, jeśli stosuje się dawkę początkową inną niż 5000 mg/kg, to badanie podąży do 5000 mg/kg w przypadku wyniku C w 2000 mg/kg; następnie wynik A 5000 mg/kg spowoduje przypisanie substancji do Kategorii 5 GHS, a wyniki B lub C spowodują brak klasyfikacji substancji.

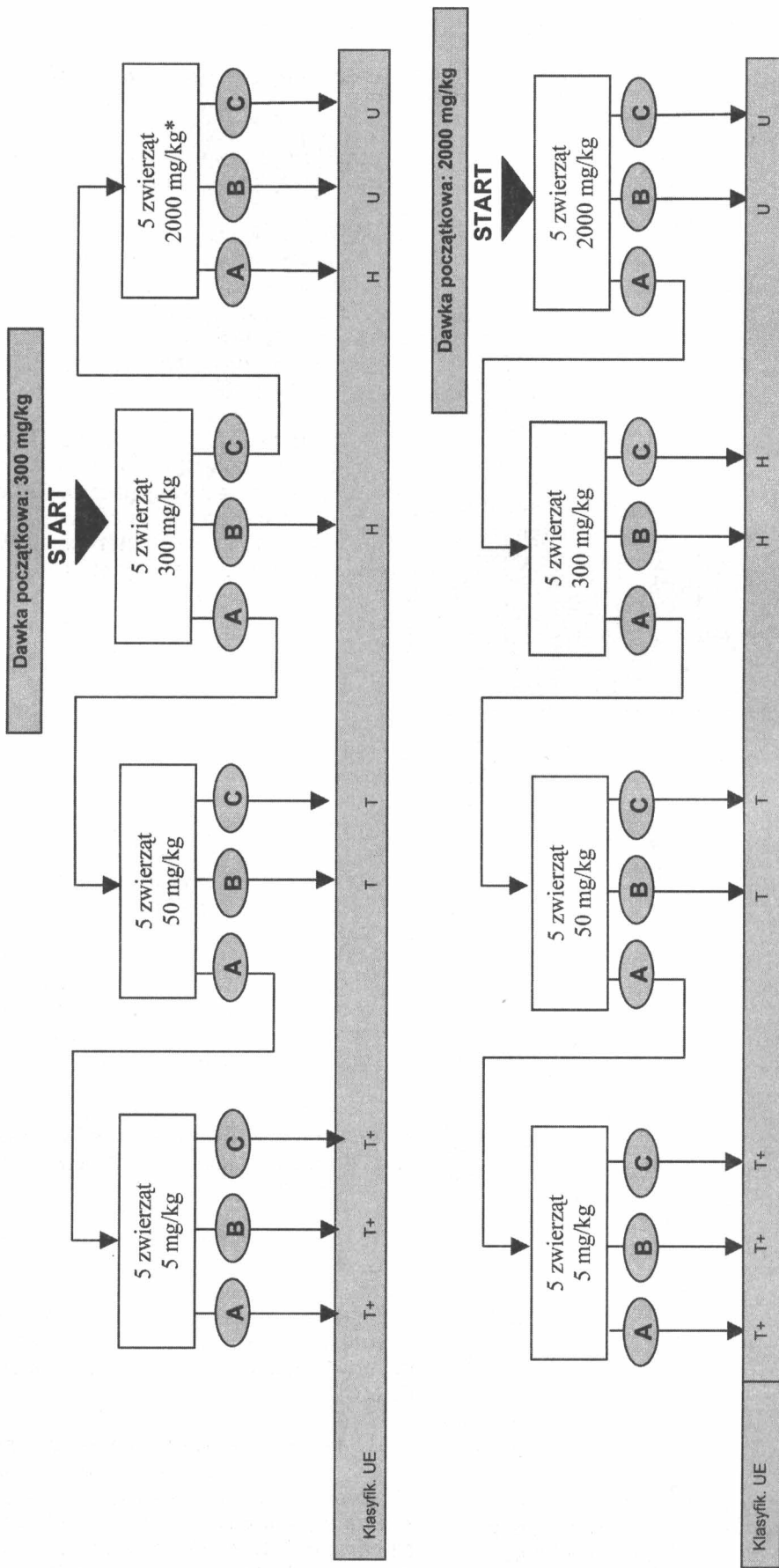
SCHEMAT 3:

**METODA BADAWCZA B.1.bis — Przewodnik do klasyfikacji według schematu UE na okres przejściowy do pełnego wdrożenia Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)**



**SCHEMAT 3:**

**METODA BADAWCZA B.1.bis** — Przewodnik do klasyfikacji według schematu UE na okres przejściowy do pełnego wdrożenia Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)



**Wielkość grupy**  
5 zwierząt w każdej grupie badania głównego zawiera każde zwierzę badane w tej dawce w badaniu wstępnym

**\*Przekroczenie dobrostanu zwierząt**  
Jeżeli ta dawka spowodowała śmierć w badaniu wstępnym, to dalsze zwierzęta nie będą badane. Przejdź do **A**

T+ = bardzo toksyczny  
T = toksyczny  
H = szkodliwy  
U = nieklasyfik.

**Wynik**

**A** 2 zgony

**B**  $\geq 1$  z widoczną toksycznością i/lub 1 zgonem

**C** Brak widocznej toksyczności i zgonu



## B.1.TRIS. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (PODANIE DROGĄ POKARMOWĄ) — METODA KLAS TOKSYCZNOŚCI OSTREJ

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 423 (2001).

#### 1.1. Wstęp

Metoda klas toksyczności ostrej (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa) jest etapową procedurą, w której wykorzystuje się na każdym etapie 3 zwierzęta jednej płci. W zależności od śmiertelności i/lub stanu agonii zwierząt konieczne mogą być średnio 2—4 etapy dla ustalenia ostrej toksyczności badanej substancji. Procedura ta jest odtwarzalna, wykorzystuje się małą ilość zwierząt. Umożliwia ona uszeregowanie substancji w sposób podobny, jak inne metody badania toksyczności ostrej. Metoda klasy toksyczności ostrej opiera się na szacunkach biometrycznych (zobacz pozycje 2, 3, 4 i 5 piśmiennictwa) w ustalonych, odpowiednio rozdzielonych dawkach tak, aby umożliwić zaszerogowanie substancji do odpowiedniej klasy i ocenić zagrożenia. Metoda przyjęta w 1996 r. poddana została procesom walidacji *in vivo* w stosunku do danych wartości  $LD_{50}$  uzyskanych z piśmiennictwa krajowego (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa) i międzynarodowego (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa).

Wytyczne, co do wyboru najbardziej właściwej metody badawczej służącej temu celowi, podane są w Wytycznych Toksyczności Ostrej po Podaniu Drogą Pokarmową (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Dokument ten zawiera także dodatkowe informacje, dotyczące przeprowadzenia badań i ich interpretacji Metodą B.1.tris.

Zasadą metody jest, aby nie podawać substancji w dawkach, w stosunku do których jest pewność, że powodują znaczny ból i cierpienie z powodu ich ostrego działania drażniącego lub żrącego. Zwierzęta w agonii lub w widoczny sposób cierpiące bądź też wykazujące oznaki silnego i trwałego bólu powinny być w humanitarny sposób uśmiercone, a w interpretacji wyników powinny zostać traktowane tak samo jak zwierzęta, które padły podczas badania. Kryteria podjęcia decyzji o uśmierceniu zwierząt w agonii lub cierpiących oraz wytyczne co do rozpoznawania przewidywanej lub nieuchronnej śmierci są przedmiotem osobnych Wytycznych (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

Metoda opiera się na zastosowaniu wcześniej ustalonych dawek oraz pozwala na uszeregowanie i sklasyfikowanie substancji zgodnie z zasadami Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) w zakresie klasyfikacji substancji chemicznych powodujących zatrucie ostre (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

W zasadzie metoda ta nie ma na celu wyznaczania dokładnych wartości  $LD_{50}$ , ale pozwala na określenie zdefiniowanych zakresów dawek, w których spodziewany jest śmiertelny skutek z uwagi na fakt, że padnię-

cie części zwierząt wciąż jest podstawowym kryterium oceny tego badania. Metoda pozwala na wyznaczenie wartości  $LD_{50}$  tylko wtedy, gdy przynajmniej dwie dawki powodują śmiertelność wyższą niż 0 % i niższą niż 100 %. Zastosowanie wcześniej ustalonych dawek, bez względu na badaną substancję, z klasyfikacją związaną wyłącznie z liczbą zwierząt znajdujących się w różnych stanach polepsza zgodność wyników uzyskanych w różnych laboratoriach oraz ich powtarzalność.

Przed przystąpieniem do badania wykonujący je powinien wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji. Do takich informacji zalicza się tożsamość i budowę chemiczną substancji, jej właściwości fizykochemiczne, wyniki innych badań toksykologicznych *in vitro* lub *in vivo*, dane toksykologiczne dla substancji o podobnej budowie chemicznej oraz przewidywane zastosowanie(a) tej substancji. Takie informacje są konieczne w celu przekonania wszystkich zainteresowanych, że badanie jest odpowiednie dla ochrony zdrowia ludzkiego i odpowiednie do właściwego wyboru dawki początkowej.

#### 1.2. Definicje

**Toksyczność ostra po podaniu drogą pokarmową:** oznacza wszystkie szkodliwe skutki, które występują po podaniu substancji drogą pokarmową w pojedynczej dawce lub w wielu dawkach, podanych w czasie 24 godzin.

**Zgon opóźniony:** oznacza, że zwierzę nie pada lub nie znajduje się w stanie agonii w czasie 48 godzin od podania badanej substancji, ale pada później w czasie 14-dniowego okresu obserwacji.

**Dawka:** jest ilością badanej substancji podanej zwierzęciu. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji przypadającą na jednostkę masy ciała zwierzęcia (np. mg/kg).

**GHS:** Światowy System Zharmonizowany. Wspólne przedsięwzięcie OECD (zdrowie i środowisko), Komitetu Ekspertów ONZ ds. Transportu Towarów Niebezpiecznych (właściwości fizykochemiczne), ILO (informacja o zagrożeniach) i koordynowane przez Międzynarodowy Program Zarządzania Chemikaliami (IOMC).

**Nieuchronny zgon:** oznacza spodziewany stan agonii lub zgon po przedłużeniu czasu obserwacji. Do objawów mogących wskazywać na taki stan u gryzoni zalicza się konwulsje, położenie boczne, pozycję leżącą i drgawki (bardziej szczegółowy opis można znaleźć w Human Endpoints Guidance Document, zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

**$LD_{50}$  (medialna dawka śmiertelna):** jest statystycznie obliczoną pojedynczą dawką substancji, która spo-

woduje zgon 50 % zwierząt po podaniu drogą pokarmową. Wartość  $LD_{50}$  jest wyrażana w postaci masy badanej substancji przypadającej na jednostkę masy badanego zwierzęcia (mg/kg).

**Dawka graniczna:** odnosi się do górnego ograniczenia dawki w badaniu (2000 lub 5000 mg/kg).

**Stan agonii:** stan umierania lub niezdolności do przeżycia pomimo prowadzenia postępowania leczniczego (bardziej szczegółowy opis można znaleźć w Humane Endpoints Guidance Document, zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

**Prognozowany zgon:** występowanie objawów klinicznych świadczących o zgonie w przewidywalnym okresie w przyszłości przed upływem zakończenia doświadczenia, np. niezdolność do picia wody lub spożywania paszy (bardziej szczegółowy opis można znaleźć w Humane Endpoints Guidance Document, zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

### 1.3. Zasada metody badawczej

Zasadą badania zaplanowanego jako etapowe i w którym stosuje się minimalną liczbę zwierząt w poszczególnych etapach jest otrzymanie wystarczającej informacji o toksyczności ostrej badanej substancji, która umożliwi klasyfikację tej substancji. Substancję, w ilości równej jednej z wybranych dawek, podaje się drogą pokarmową grupie zwierząt doświadczalnych. Substancję bada się stopniowo, przy czym na każdym poziomie doświadczenia stosuje się 3 zwierzęta tej samej płci (zazwyczaj samice). Wystąpienie na którymkolwiek etapie związanym z narażeniem na daną substancję skutku śmiertelnego lub jego brak warunkuje podjęcie dalszych badań, np.:

- nie ma potrzeby wykonywania dalszych badań,
- należy podać tę samą dawkę substancji trzem dodatkowym zwierzętom,
- należy podać następną wyższą lub poprzedzającą niższą dawkę substancji trzem dodatkowym zwierzętom.

Szczegóły procedury opisane są w Schemacie 1. Metoda pozwala na zaklasyfikowanie badanej substancji do jednej z klas toksyczności określonych przez ustalone wartości graniczne  $LD_{50}$ .

### 1.4. Opis metody badawczej

#### 1.4.1. Wybór gatunku zwierząt

Zalecanym gatunkiem gryzoni jest szczur, chociaż mogą być również stosowane inne gatunki gryzoni. W badaniach zazwyczaj używa się samic (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Jest to uzasadnione opisanymi w literaturze wynikami konwencjonalnych badań służących do określenia wartości  $LD_{50}$ , które wykazują, że zazwyczaj istnieje niewielka różnica we wrażliwości pomiędzy samcami a samicami gryzoni; a w tych przypadkach, w których obserwowane są różnice, samice

są na ogół nieco bardziej wrażliwe (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa). Jeżeli wiedza o toksykologicznych lub toksykokinetycznych właściwościach strukturalnie podobnych substancji wskazuje na większe prawdopodobieństwo, że samce mogą być bardziej wrażliwe, wówczas do badań powinny być użyte szczury tej płci. Gdy badanie prowadzi się na samcach, należy podać wyraźne uzasadnienie.

Stosowane powinny być młode, dojrzałe, zdrowe osobniki powszechnie używanych ras laboratoryjnych. Samice powinny być dziewicze i nieciążarne. Każde zwierzę na początku doświadczenia powinno być w wieku 8 do 12 tygodni, a jego masa powinna zawierać się w przedziale  $\pm 20$  % średniej masy poprzednio narażonych zwierząt.

#### 1.4.2. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50–60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody. Zwierzęta mogą być pogrupowane w klatkach wg otrzymywanej dawki, ale liczba zwierząt przypadających na klatkę nie może zakłócać dokładnych obserwacji każdego zwierzęcia.

#### 1.4.3. Przygotowanie zwierząt

Zwierzęta są wybierane losowo, znakowane dla umożliwienia identyfikacji każdego osobnika i w celu aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych przetrzymywane w klatkach przynajmniej 5 dni przed rozpoczęciem podawania substancji.

#### 1.4.4. Przygotowanie określonych dawek substancji i ich podawanie

Zasadniczo substancje badane, niezależnie od dawki, powinny być podawane w stałej objętości poprzez zróżnicowanie stężenia podawanego preparatu. Gdy bada się produkt końcowy w postaci ciekłej lub mieszaninę, wówczas zastosowanie nierozcieńczonej badanej substancji, tj. w stałym stężeniu, może być bardziej odpowiednie i wymagane przez niektóre urzędy dla następującej w dalszej kolejności oceny ryzyka tej substancji. W każdym z tych przypadków nie należy przekraczać maksymalnej objętości podawanej dawki. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana jednorazowo, zależy od rozmiarów zwierzęcia. U gryzoni objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, jednakże w przypadku roztworów wodnych można wziąć pod uwagę objętość 2 ml/100 g masy ciała. O ile jest to tylko możliwe, to w przypadku różnych postaci (formulacji) podawanego preparatu zaleca się w pierwszej kolejności użycie wodnych roztworów/zawiesin/emulsji, a w następnej kolejności wskazane są roztwory/zawiesiny/emulsje w oleju (np. oleju kukurydzianym), a w ostateczności

roztwory w innych rozpuszczalnikach. Powinny być znane własności toksykologiczne nośników innych niż woda. Podawane roztwory muszą być przygotowane na krótko przed ich podaniem, chyba że stabilność preparatu w okresie dłuższym od okresu, w jakim przeprowadzono badanie, jest znana i akceptowalna.

## 1.5. Sposób postępowania

### 1.5.1. Podawanie substancji

Badana substancja jest podawana jednorazowo w pojedynczej dawce za pomocą sondy dożołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. W przypadku gdy jednorazowe podanie całej dawki jest niemożliwe może być ona podana w porcjach, przy czym czas podania całej dawki nie może przekroczyć 24 godzin.

Zwierzęta przed podaniem badanej substancji powinny być głodzone (np.: w przypadku szczurów należy głodzić je na noc przed badaniem, a w przypadku myszy należy głodzić je na 3—4 godziny przed badaniem). Nie należy wstrzymywać podawania wody. Po okresie głodzenia zwierzęta powinny być zważone, a następnie należy podać im badaną substancję. Po jej podaniu paszy nie powinno się podawać zwierzętom przez 3—4 godziny w przypadku szczurów, a 1—2 godziny w przypadku myszy. Gdy badana substancja jest podawana w kilku porcjach, może ze względu na długość okresu narażania okazać się konieczne dostarczenie zwierzętom paszy i wody w trakcie narażania.

### 1.5.2. Liczba zwierząt i poziomy dawek

W każdym etapie badania stosuje się trzy zwierzęta. Dawka, która ma być podana jako początkowa, jest wybierana z czterech ustalonych poziomów: 5, 50, 300 i 2000 mg/kg masy ciała. Dawką początkową powinna być ta, która w sposób najbardziej prawdopodobny spowoduje śmiertelność u niektórych narażonych zwierząt. Schemat 1 przedstawia sposób postępowania dla każdej dawki początkowej. Ponadto Schemat 4 przedstawia wytyczne co do klasyfikacji według systemu UE obowiązującego do czasu wdrożenia systemu GHS.

Gdy dostępne dane sugerują, że śmiertelność prawdopodobnie nie wystąpi w najwyższej z dawek początkowych (2000 mg/kg masy ciała), wówczas powinno być wykonane badanie dla dawek granicznych. Gdy dla badanej substancji brak jest jakichkolwiek informacji, to dla dobra zwierząt zaleca się stosowanie dawki 300 mg/kg masy ciała jako dawki początkowej.

Odstępy czasowe pomiędzy podawaniem substancji w kolejnych dawkach są określone przez pojawienie się, czas trwania i nasilenie objawów toksyczności. Badanie zwierząt przez narażenie na substancję w kolejnej dawce powinno być wstrzymane do czasu uzyskania pewności co do przeżycia uprzednio narażonych zwierząt.

Wyjątkowo i tylko w przypadkach uzasadnionych wymaganiami prawnymi może być brane pod uwagę zastosowanie dawki 5000 mg/kg masy ciała (Kryteria

Klasyfikacji). Dla dobra zwierząt odradza się badanie w zakresie Kategorii 5 wg GHS (2000 do 5000 mg/kg). Powinno być ono brane pod uwagę tylko wówczas, gdy istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że wyniki takiego badania będą miały bezpośrednie znaczenie dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt.

### 1.5.3. Badanie dawki granicznej

Badanie dawek granicznych wykonywane jest w sytuacjach, gdy osoba przeprowadzająca doświadczenie posiada informacje, że badany materiał jest prawdopodobnie nietoksyczny, tj. gdy przejawia on objawy toksyczności w dawkach powyżej górnych, wymaganych przez prawo poziomów. Informacje o toksyczności badanego materiału mogą pochodzić z badań podobnych związków lub podobnych zarówno pod względem składu jakościowego i ilościowego produktów. W przypadku braku informacji o toksyczności bądź też przypuszczeń, że badany materiał jest toksyczny, należy przeprowadzić badanie właściwe.

Badanie dawek granicznych może być wykonane na sześciu zwierzętach (trzy zwierzęta w każdym etapie) przy zastosowaniu jednej dawki 2000 mg/kg masy ciała. W sytuacjach wyjątkowych badanie graniczne może być wykonane na trzech zwierzętach przy użyciu substancji w dawce 5000 mg/kg (Kryteria Klasyfikacji). Jeżeli narażenie na badaną substancję spowoduje wystąpienie śmiertelności, to może okazać się konieczne wykonanie dalszego badania dla kolejnej, niższej dawki.

## 1.6. Obserwacje

Obserwacje należy prowadzić dla każdego pojedynczego zwierzęcia, przynajmniej raz podczas pierwszych 30 minut po podaniu badanej substancji i okresowo podczas pierwszych 24 godzin, ze zwróceniem szczególnej uwagi podczas pierwszych 4 godzin. Obserwację zwierząt należy przeprowadzić codziennie przez 14 dni, z wyjątkiem przypadków, gdy muszą być one usuwane z badania i w sposób humanitarny uśmiercane lub gdy są martwe. Okres obserwacji nie powinien być jednak ustalony sztywno. Powinien być określony przez reakcje toksyczne, czas ich rozpoczęcia i długość okresu powrotu do stanu normalnego i dlatego, gdy uzna się to za konieczne, może być odpowiednio wydłużony. Okresy pojawiania się i znikania objawów toksyczności są ważne, szczególnie w przypadku istnienia tendencji do wystąpienia opóźnionych objawów toksyczności (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa). Wszystkie obserwacje należy systematycznie zapisywać, prowadząc dla każdego zwierzęcia osobne zapisy.

Dodatkowe obserwacje będą konieczne, gdy zwierzęta nadal przejawiają objawy toksyczności. Należy obserwować zmiany na skórze i sierści, oczach i błonach śluzowych, a także w układzie oddechowym, układzie krążenia, ośrodkowym i autonomicznym układzie nerwowym oraz w aktywności somatomotorycznej i zachowaniu. Uwagę należy zwrócić na pojawienie się drgawek, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pod uwagę należy brać zasady i kryteria podane w Humane Endpoints Guidance Do-

cument (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa). Zwierzęta w agonii i wykazujące objawy silnego cierpienia lub bólu powinny być w sposób humanitarny uśmiercone. Dla zwierząt uśmiercanych lub martwych należy możliwie dokładnie zanotować czas padnięcia.

#### 1.6.1. Masa ciała

Masy ciała poszczególnych osobników powinny być określone na krótko przed rozpoczęciem podawania badanej substancji i następnie powinny być określone przynajmniej raz w tygodniu. Zmiany masy ciała powinny być obliczone i zapisywane. Pod koniec badania zwierzęta, które przeżyły, należy ponownie zważyć i następnie w sposób humanitarny uśmiercić.

#### 1.6.2. Badania patologiczne

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane badaniom makroskopowym podczas sekcji (także te, które padną podczas badania lub są uśmiercane z powodów humanitarnych). Należy zanotować wszystkie zmiany patologiczne, które wystąpiły u każdego zwierzęcia. Należy wziąć pod uwagę badania mikroskopowe narządów wykazujących zmiany patologiczne u zwierząt przeżywających 24 lub więcej godzin od początku podawania badanej substancji, ponieważ mogą one dostarczyć użytecznych informacji.

## 2. WYNIKI

Należy dostarczyć dane pochodzące od każdego zwierzęcia indywidualnie. Dodatkowo wszystkie dane powinny być zebrane w formie tabeli przedstawiającej dla każdej badanej grupy: liczbę użytych zwierząt, liczbę zwierząt przejawiających objawy toksyczności, liczbę zwierząt martwych i uśmierconych podczas badania, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis i czas wystąpienia objawów toksyczności i odwracalności reakcji oraz wyniki sekcji.

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- stan skupienia, czystość, gdy ma to znaczenie, także właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne, w tym numer CAS.

Nośnik (jeśli jego użycie było konieczne):

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeśli nie była nim woda.

Badane zwierzęta:

- gatunek/szczep,
- stan mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany,
- liczba, wiek i płeć zwierząt (w tym także uzasadnienie zastosowania samców zamiast samic),
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasza itp.

Warunki doświadczenia:

- szczegółowe dane dotyczące postaci (formulacji) badanej substancji, w tym stan skupienia podanego materiału,
- szczegółowe dane dotyczące sposobu podawania badanej substancji, w tym podawane objętości i czas podawania,
- szczegółowe dane dotyczące paszy i jakości wody (w tym typ i źródło paszy, źródło wody),
- podstawy wyboru dawki początkowej.

Wyniki:

- ujęte w tabeli dane dla każdego zwierzęcia i poziomu dawki (tj. zwierzęta wykazujące objawy toksyczności łącznie z śmiertelnością, nasilenie i czas trwania skutków),
- ujęte w tabeli dane dotyczące masy ciała i jej zmian,
- masa ciała poszczególnych zwierząt w dniu podawania badanej substancji i następnie w odstępach tygodniowych oraz w dniu padnięcia bądź uśmiercenia,
- data i czas padnięcia,
- czas pojawienia się objawów toksyczności i informacje, czy były one odwracalne dla każdego zwierzęcia,
- jeśli są dostępne, wyniki sekcji i wyniki badań histopatologicznych każdego zwierzęcia.

Dyskusja i interpretacja wyników.

Wnioski.

## 4. PIŚMIENNICTWO

- 1) Roll et al. (1986). *New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals*. *Toxicol. Lett. Suppl.*, 31, 86.
- 2) Roll et al. (1989). *Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien*. *Bundesgesundheitsblatt*, 32, 336—341.
- 3) Diener et al. (1994). *The biometric Evaluation of the Acute Toxic Class Method (Orla)*. *Arch. Toxicol.*, 68, 559—610.
- 4) Diener et al. (1995). *The biometric evaluation of the OECD modified version of the acute toxic class method (oral)*. *Arch. Toxicol.* 69, 729—734.
- 5) Diener et al. (1999). *Acute toxicity class methods: alterations to LD/LC50 tests*. *ALTEX* 16, 129—134.
- 6) Schlede et al. (1992). *A national validation study of the acute toxicity class method — an alternative to the LD50 test*. *Arch. Toxicol.* 66, 455—470.
- 7) Schlede et al. (1994). *The international validation study of the acute toxicity class method (oral)*. *Arch. Toxicol.* 69, 659—670.

8) OECD(2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series in Testing and Assessment No 24. Paris.

9) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as human endpoints for experimental animals used in safety evaluations. Environmental Health and Safety Monograph Series in Testing and Assessment No 19.

10) OECD (1998). Harmonized integrated hazard classification for human health and environmental effects of chemical substances.

11) Lipnick et al. (1995). Comparison of the up — and — down, conventional LD50 and fixed — dose acute toxicity procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223—231.

12) Chan et al. (1994). Chapter 16, Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed. A.Hayes editor, Raven Press, Ltd. New York, USA.

## SCHEMAT 1

### PROCEDURA POSTĘPOWANIA W PRZYPADKU KAŻDEJ Z DAWEK POCZĄTKOWYCH

#### UWAGI OGÓLNE

Dla każdej dawki początkowej podjęte powinny być następujące postępowania, według niniejszego Schematu, odpowiednio:

— Schemat 1a: dawką początkową jest 5 mg/kg masy ciała,

— Schemat 1b: dawką początkową jest 50 mg/kg masy ciała,

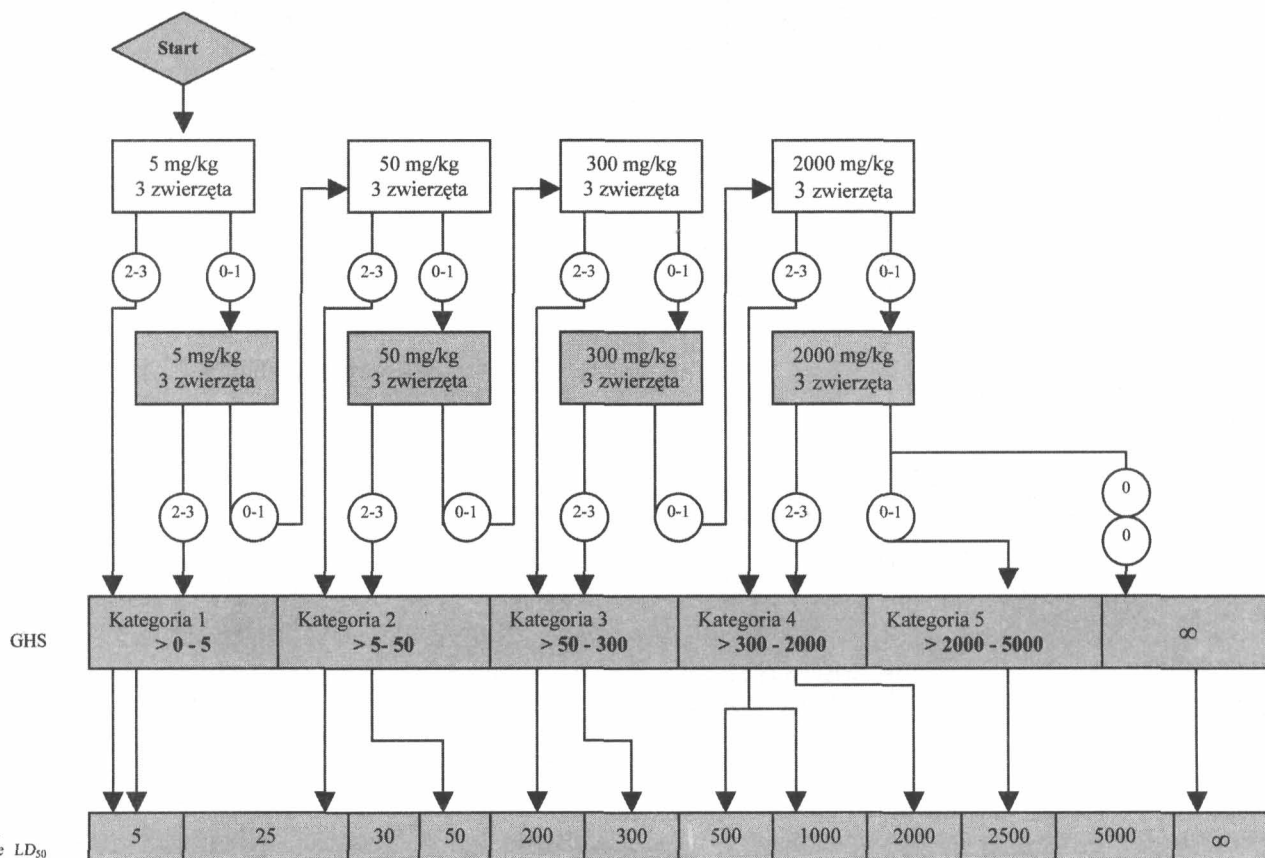
— Schemat 1c: dawką początkową jest 300 mg/kg masy ciała,

— Schemat 1d: dawką początkową jest 2000 mg/kg masy ciała.

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny lub zwierząt martwych, kolejny etap postępowania wskazują strzałki.

#### SCHEMAT 1A:

##### SPOSÓB POSTĘPOWANIA PRZY DAWCE POCZĄTKOWEJ 5 MG/KG MASY CIAŁA



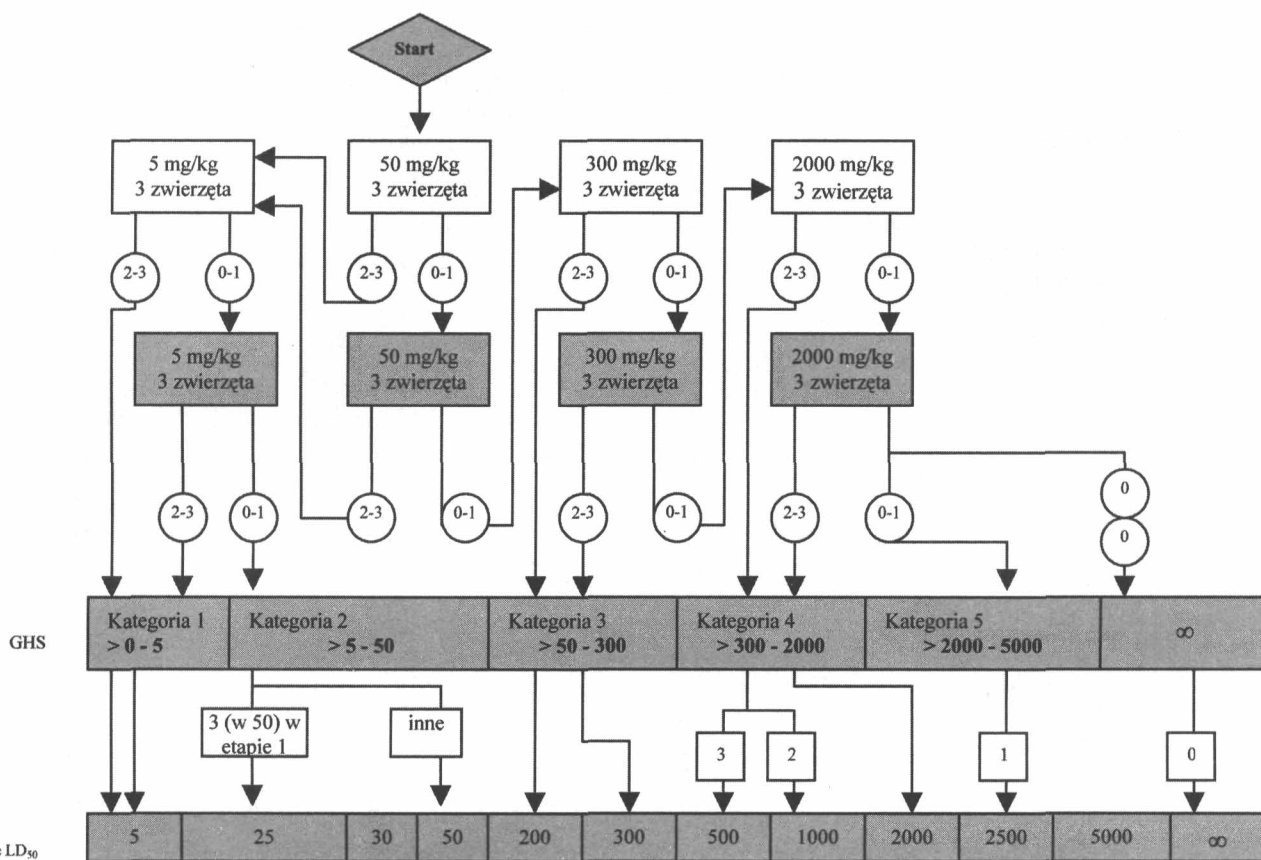
Wartości graniczne LD<sub>50</sub> mg/kg m.c.

- stosuje się 3 zwierzęta dla każdej płci na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

- ∞: nieklasyfikowane  
 - badanie w 5000 mg/kg m.c.: zobacz Kryteria Klasyfikacji

**SCHEMAT 1B:**

**SPOSÓB POSTĘPOWANIA PRZY DAWCE POCZĄTKOWEJ 50 MG/KG MASY CIAŁA**

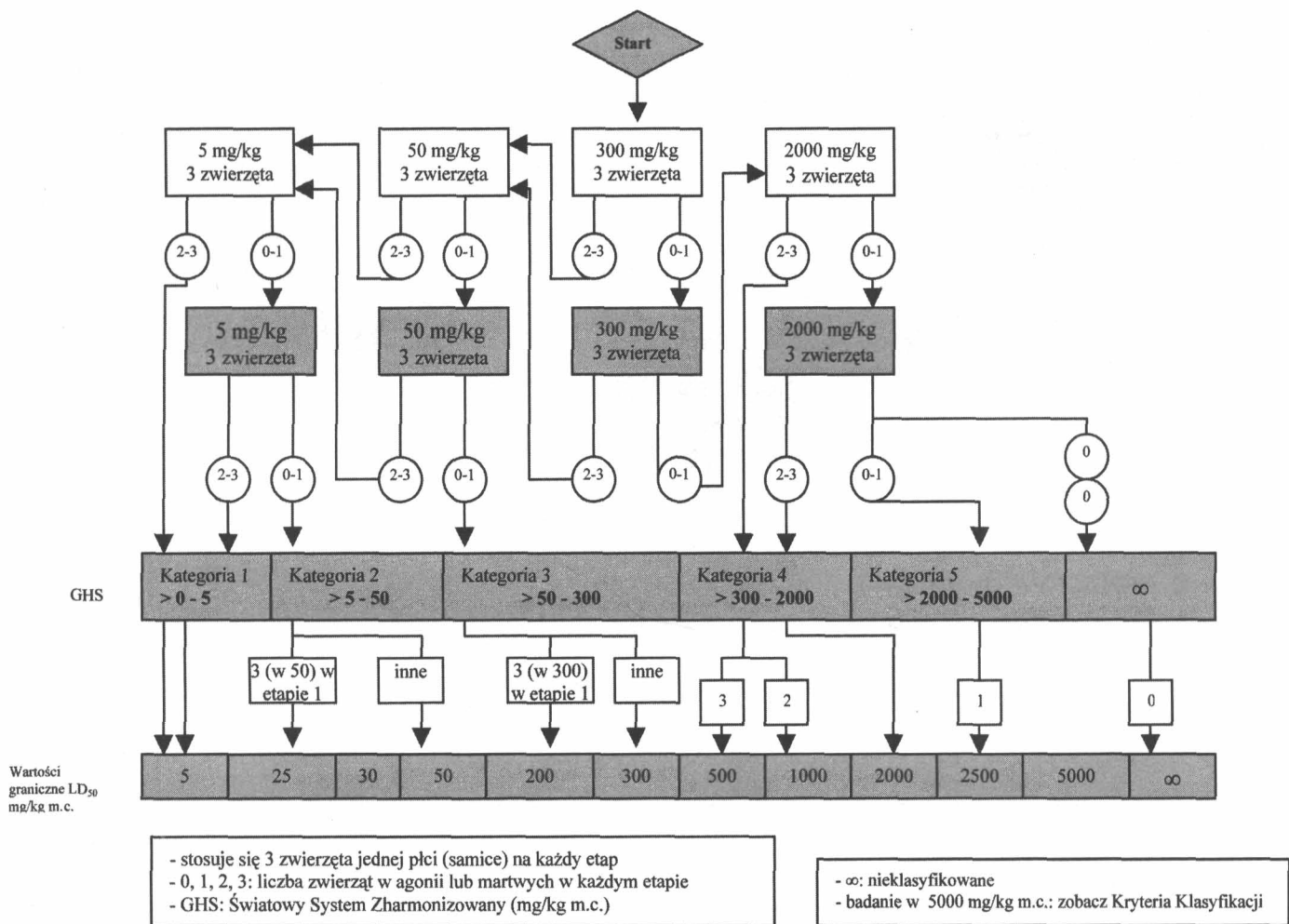


- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

- ∞: nieklasyfikowane  
 - badanie w 5000 mg/kg m.c.: zobacz Kryteria Klasyfikacji

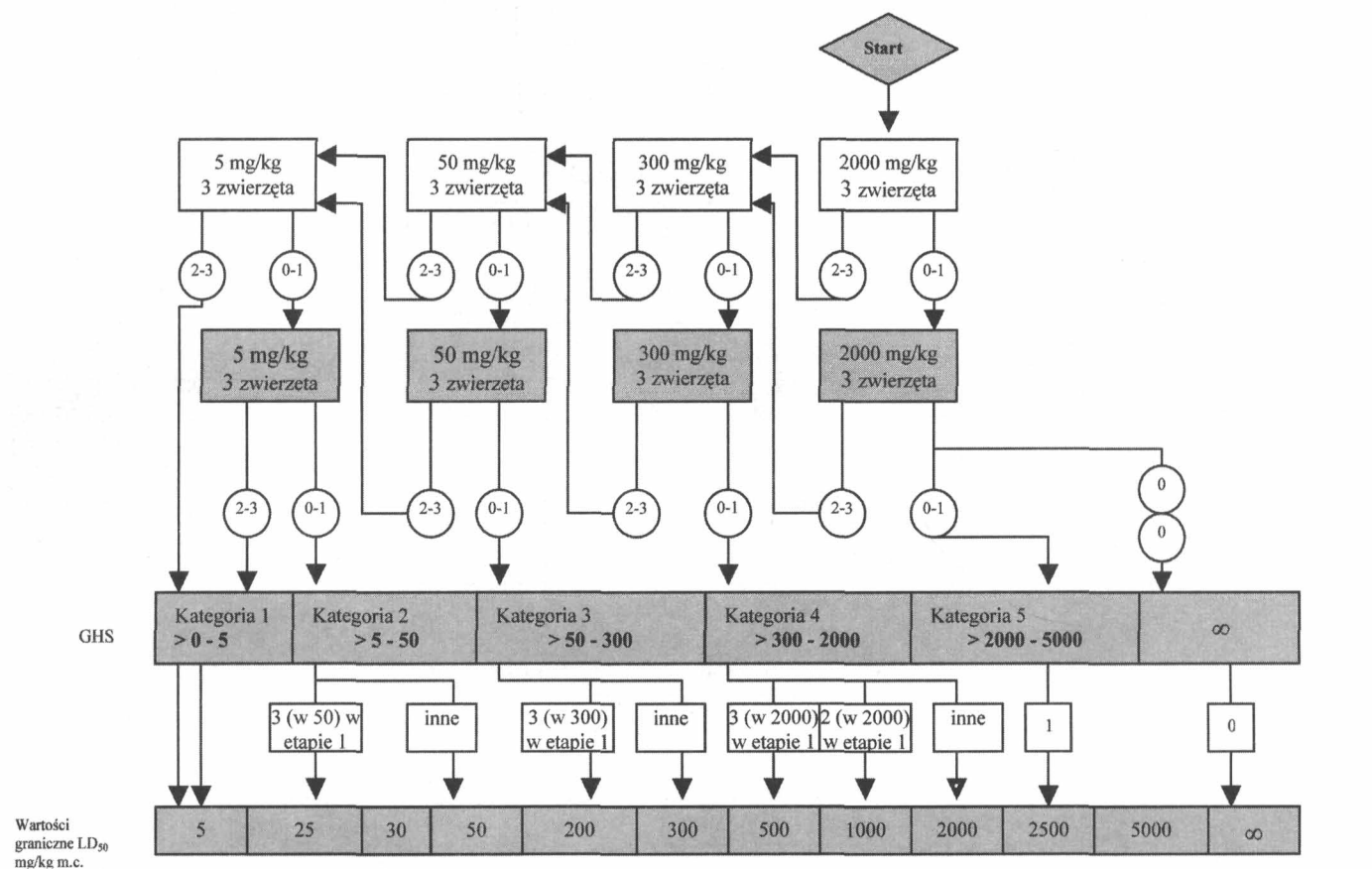
## SCHEMAT 1C:

## SPOSÓB POSTĘPOWANIA PRZY DAWCE POCZĄTKOWEJ 300 MG/KG MASY CIAŁA



## SCHEMAT 1D:

## SPÓSÓB POSTĘPOWANIA PRZY DAWCE POCZĄTKOWEJ 2000 MG/KG MASY CIAŁA



- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

- ∞: nieklasyfikowane  
 - badanie w 5000 mg/kg m.c.: zobacz Kryteria Klasyfikacji



**KRYTERIA KLASYFIKACJI****KRYTERIA KLASYFIKACJI BADANYCH SUBSTANCJI ZE SPODZIEWANYMI WARTOŚCIAMI LD<sub>50</sub> PRZEKRACZAJĄCYMI 2000 mg/kg BEZ POTRZEBY BADANIA**

Kryteria zagrożenia Kategorii 5 są przeznaczone dla identyfikacji substancji o stosunkowo niskiej toksyczności ostrej, ale w pewnych okolicznościach mogą one stanowić zagrożenie dla wrażliwej populacji. Przewiduje się, że substancje te mają doustne lub skórne LD<sub>50</sub> w zakresie 2000 do 5000 mg/kg lub równoważne dawki poprzez inne drogi narażenia. Substancje badane mogą być zaklasyfikowane do klasy zagrożenia według klasyfikacji zdefiniowanej przez: 2000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5000 mg/kg (Kategoria 5 w GHS) w następujących przypadkach:

- a) jeżeli skierowane do tej kategorii przez schemat badawczy (Schematy 1a—1d) w oparciu o występowanie śmiertelności,
- b) jeżeli istnieją wiarygodne dowody, które wykazują, że LD<sub>50</sub> będzie w zakresie Kategorii 5; lub inne badania na zwierzętach lub skutki toksyczne u ludzi wskazują ostre działanie na zdrowie ludzkie,
- c) przez ekstrapolację, oszacowanie lub pomiar danych, jeżeli przypisanie do bardziej niebezpiecznej klasy nie jest gwarantowane i:
  - dostępne są wiarygodne informacje wskazujące na znaczące objawy toksyczności u ludzi lub
  - nie obserwuje się śmiertelności podczas badania aż do wartości Kategorii 4 po podaniu drogą pokarmową, lub

— gdy opinia ekspertów potwierdza znaczące objawy kliniczne toksyczności, podczas badania aż do wartości Kategorii 4, z wyjątkiem biegunki, nastroszenia sierści lub niedobrego wyglądu zewnętrznego, lub

— gdy opinia ekspertów potwierdza wiarygodne informacje wskazujące potencjał znaczących ostrych objawów w innych badaniach na zwierzętach.

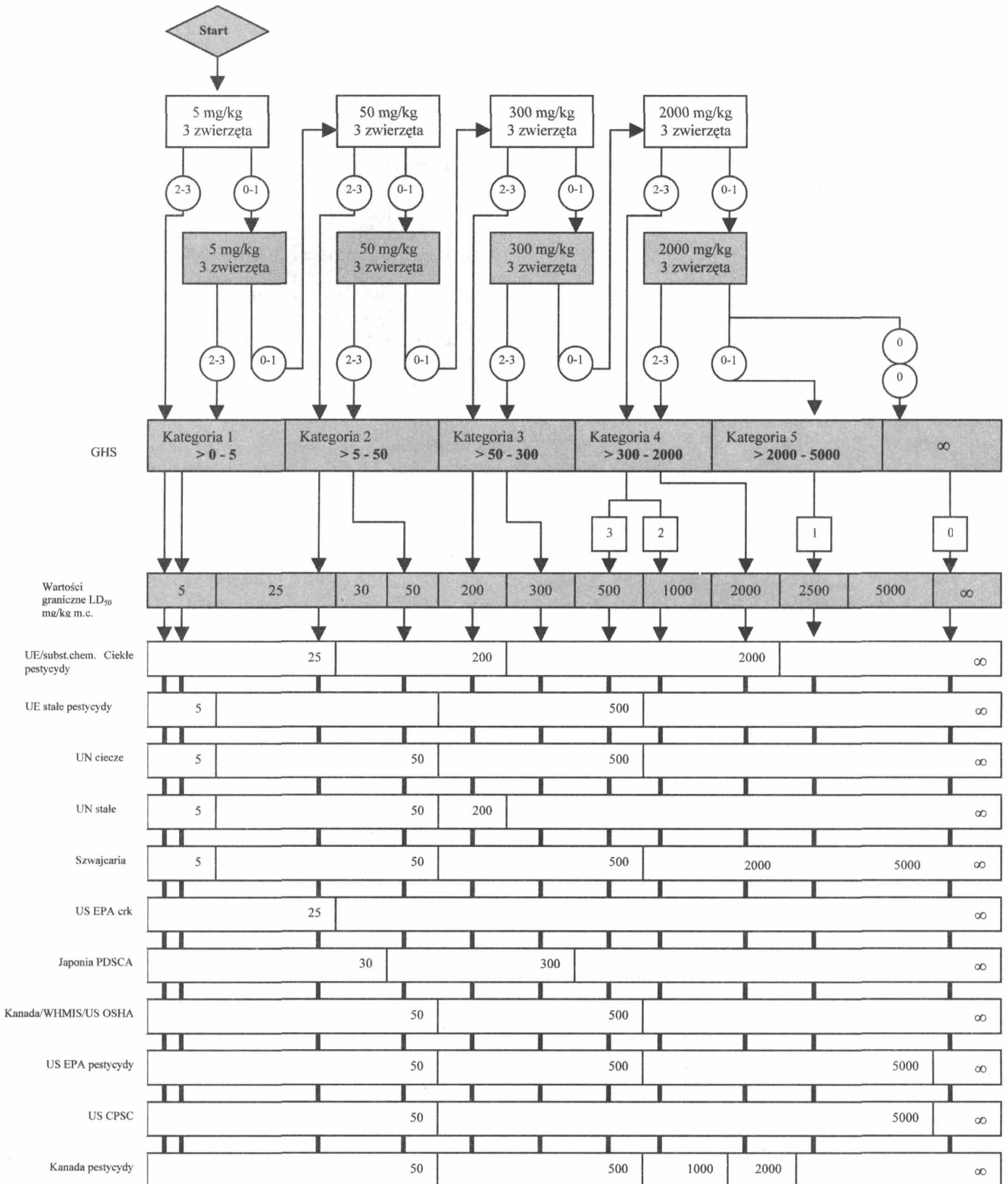
**BADANIE W DAWKACH POWYŻEJ 2000 mg/kg**

W wyjątkowych sytuacjach, uzasadnionych tylko przez szczególne wymagania prawne, pod uwagę może być brane zastosowanie najwyższej ustalonej dawki 5000 mg/kg. Dla dobra zwierząt badanie dawki 5000 mg/kg nie jest zalecane i powinno być stosowane tylko gdy istnieje silne prawdopodobieństwo, że wyniki takich badań będą miały bezpośrednie znaczenie dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

Gdy wymagane jest badanie dawki 5000 mg/kg, prowadzi się tylko jeden etap (tj. trzy zwierzęta będą stosowane). Jeżeli pierwsze zadawkowane zwierzę padnie, dalsze dawkowanie następuje w 2000 mg/kg zgodnie z procedurą według Schematu 1. Jeżeli pierwsze zwierzę przeżyje, to dawkowane są dwa dalsze zwierzęta. Jeżeli tylko jedno z trzech zwierząt padnie, to LD<sub>50</sub> prawdopodobnie przekracza 5000 mg/kg. Jeżeli zginą dwa osobniki, to dawkowanie przechodzi do poziomu 2000 mg/kg.

**SCHEMAT 2:**

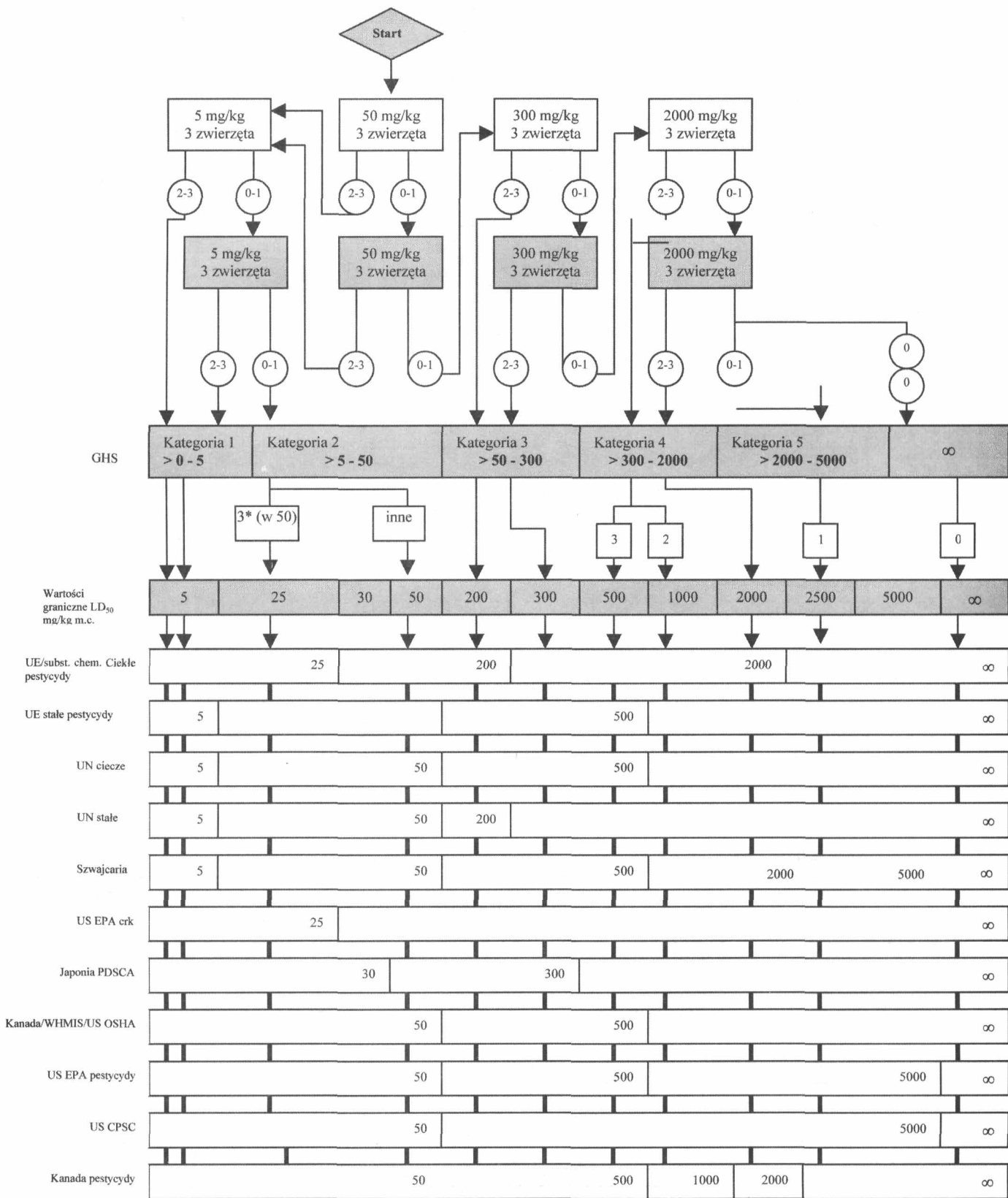
**METODA BADAWCZA B.1.tris: Przewodnik do klasyfikacji według systemu UE na okres przejściowy przed pełnym wdrożeniem Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)**



- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie  
 - ∞: nieklasyfikowane  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

**SCHEMAT 2 (kontynuowany):**

**METODA BADAWCZA B.1.tris: Przewodnik do klasyfikacji według systemu UE na okres przejściowy przed pełnym wdrożeniem Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)**

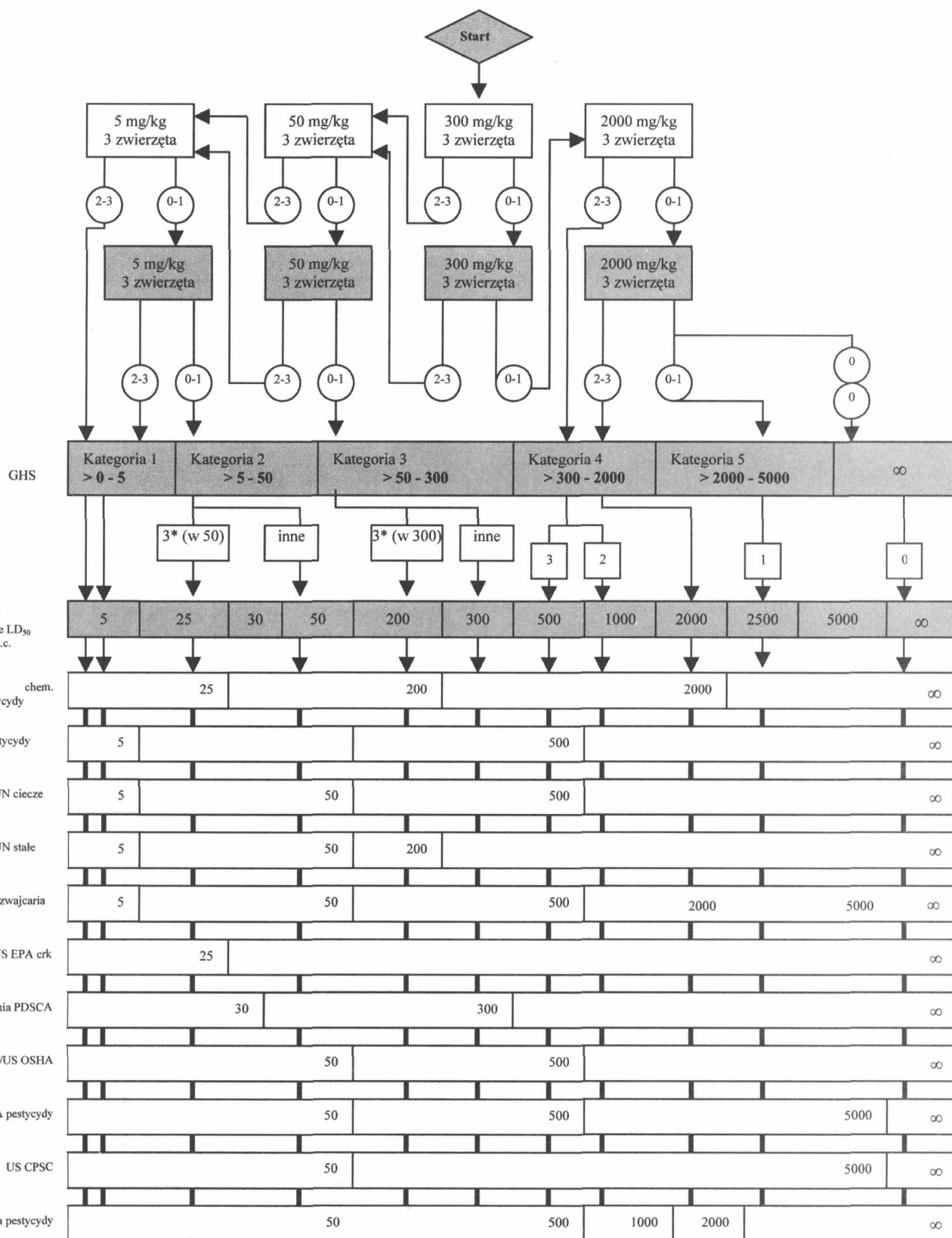


- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie

- ∞: nieklasyfikowane  
 - \*: w pierwszym etapie  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

## SCHEMAT 2 (kontynuowany):

**METODA BADAWCZA B.1.tris: Przewodnik do klasyfikacji według systemu UE na okres przejściowy przed pełnym wdrożeniem Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)**

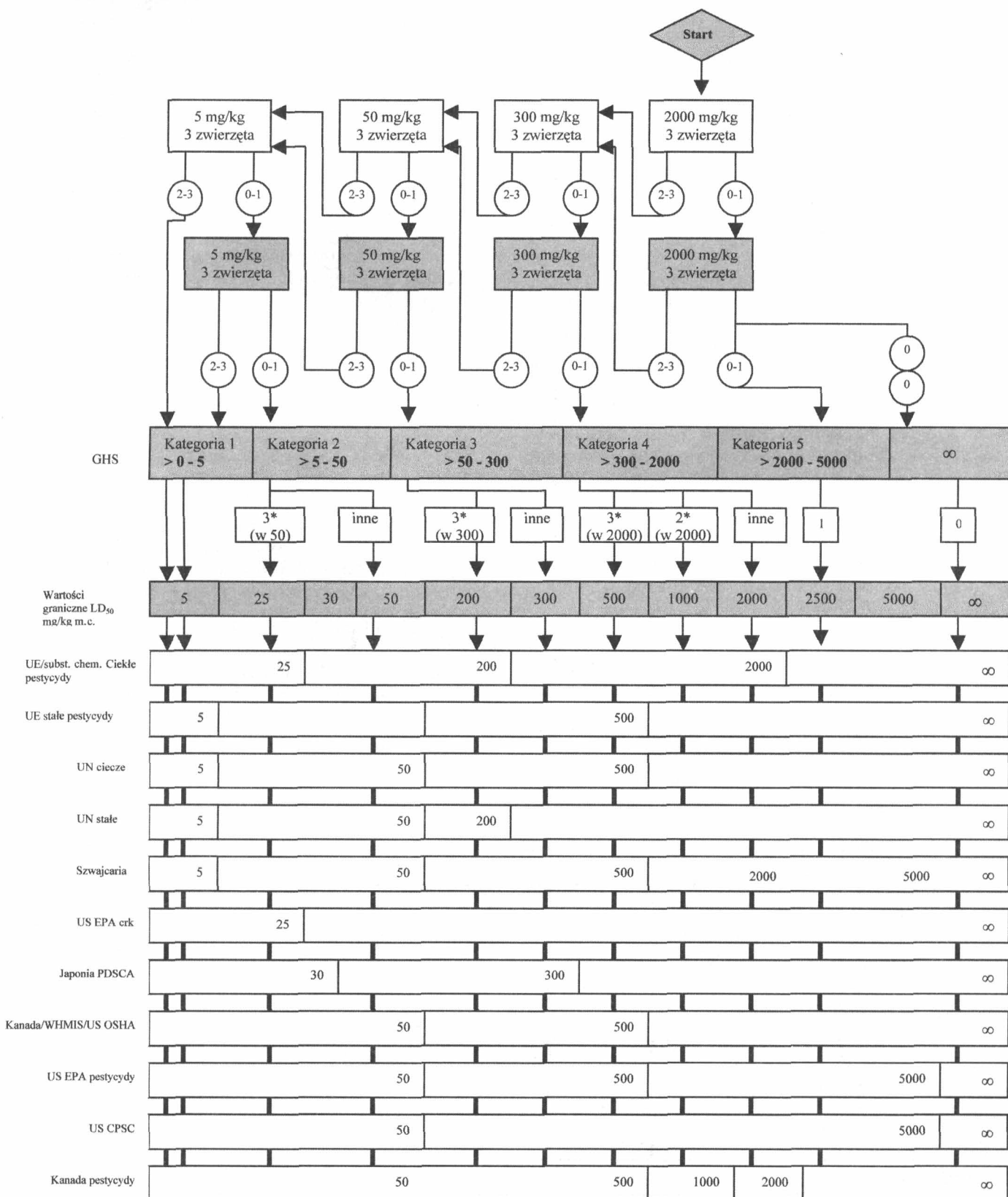


- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
- 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie

- ∞: nieklasyfikowane  
- \*: w pierwszym etapie  
- GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

**SCHEMAT 2 (kontynuowany):**

**METODA BADAWCZA B.1.tris: Przewodnik do klasyfikacji według systemu UE na okres przejściowy przed pełnym wdrożeniem Światowego Systemu Zharmonizowanego (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa)**



- stosuje się 3 zwierzęta jednej płci (samice) na każdy etap  
 - 0, 1, 2, 3: liczba zwierząt w agonii lub martwych w każdym etapie

- ∞: nieklasyfikowane  
 - \*: w pierwszym etapie  
 - GHS: Światowy System Zharmonizowany (mg/kg m.c.)

## B.4. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA: DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE/ŻRĄCE NA SKÓRĘ

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 404 (2002).

#### 1.1. Wstęp

Podczas opracowywania niniejszej metody szczególną uwagę zwrócono na możliwość jej ulepszenia, biorąc pod uwagę dobro zwierząt i oszacowanie wszystkich istniejących informacji dotyczących badanej substancji w celu uniknięcia zbędnych badań na zwierzętach laboratoryjnych. W metodzie tej przed podjęciem badania działania drażniącego/żrącego badanej substancji na skórę *in vivo* zaleca się wykonanie oceny wagi dowodów istniejących danych. Jeżeli są dostępne niepełne dane, to mogą być one uzupełnione przez zastosowanie badania sekwencyjnego (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Strategia badawcza zawiera wykonanie zwalidowanych i akceptowanych badań *in vitro*, a przedstawiona jest ona w Schemacie załączonym do niniejszej metody. Ponadto zaleca się, jeżeli to właściwe, sekwencyjne a nie jednoczesne stosowanie trzech pól do przeprowadzenia testów płatkowych na zwierzęciu we wstępnym badaniu *in vivo*.

Uwzględniając zarówno przesłanki naukowe jak i dobro zwierząt, nie należy wykonywać badań *in vivo*, przed przeprowadzeniem analizy wagi dowodów wszystkich dostępnych danych istotnych dla identyfikacji potencjalnego działania drażniącego/żrącego substancji na skórę. Dane takie powinny zawierać dowody otrzymane w badaniach wykonanych u ludzi i na zwierzętach laboratoryjnych, dowody o działaniu żrącym/drażniącym jednej lub więcej podobnych strukturalnie substancji lub mieszanin takich substancji, dane wskazujące na silną kwasowość lub zasadowość substancji (zobacz pozycje 2 i 3 piśmiennictwa), a także wyniki zwalidowanych i akceptowanych badań wykonanych w warunkach *in vitro* lub *ex vivo* (zobacz pozycje 4, 5 i 6 piśmiennictwa). Taka analiza powinna ograniczyć potrzeby wykonywania w warunkach *in vivo* oceny działania drażniącego/żrącego na skórę w przypadku substancji, dla których już zebrano wystarczające dowody z innych badań tych dwóch kierunków działania toksycznego.

Zalecana strategia badania etapowego, obejmująca przeprowadzenie badań działania drażniącego/żrącego za pomocą zwalidowanych i akceptowanych metod *in vitro* lub *ex vivo*, jest dołączona w formie Schematu stanowiącego dodatek do niniejszej metody. Strategia ta została opracowana i jednomyślnie zalecona przez uczestników warsztatów OECD (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa) oraz przyjęta jako zalecana strategia badawcza w Światowym Systemie Zharmonizowanym (GHS) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Zaleca się, by ww. strategia badawcza była podjęta przed wykonaniem badania *in vivo*. W celu uzyskania danych o przesłankach naukowych dotyczących działania drażniącego/żrącego dla nowych substancji zale-

ca się sposób badania etapowego. Dla substancji istniejących o niewystarczających danych dotyczących działania drażniącego/żrącego na skórę strategię tę należy stosować dla uzupełnienia brakujących danych. Zastosowanie innej strategii badawczej lub sposobu postępowania bądź też podjęcie decyzji o niestosowaniu etapowego sposobu badania musi być uzasadnione.

Jeżeli za pomocą analizy wagi dowodów nie można ustalić, czy dana substancja posiada właściwości drażniące lub żrące, to wówczas, zgodnie ze strategią etapowego badania, należy podjąć decyzję o przeprowadzeniu badania *in vivo* (zobacz Schemat).

#### 1.2. Definicje

**Działanie drażniące na skórę:** jest to wywołanie odwracalnego uszkodzenia skóry w czasie do 4 godzin po nałożeniu badanej substancji.

**Działanie żrące na skórę:** jest to wywołanie nieodwracalnych uszkodzeń skóry; w postaci widocznej martwicy naskórka i skóry w czasie do 4 godzin po nałożeniu badanej substancji. Działanie żrące charakteryzuje się wrzodami, krwawieniem, krwawymi strupami i na końcu 14-dniowego okresu obserwacji odbarwieniem powodowanym łuszczeniem się skóry, całkowitym miejscowym wyłysieniem oraz bliznami. Dla oceny wątpliwych uszkodzeń należy uwzględnić badania histopatologiczne.

#### 1.3. Zasada metody badawczej

Badaną substancję nanosi się w pojedynczej dawce na skórę zwierzęcia doświadczalnego; nienarażane pola skóry zwierzęcia doświadczalnego służą jako kontrola. W celu uzyskania całkowitej oceny skutków stopień działania drażniącego/żrącego jest odczytywany i punktowany w ustalonych odstępach czasu, a następnie opisywany. Czas trwania badania powinien być wystarczający dla oceny odwracalności lub nieodwracalności obserwowanych skutków.

Zwierzęta wykazujące ciągłe oznaki ciężkiego wstrząsu i/lub bólu na jakimkolwiek etapie badań muszą być w sposób humanitarny uśmiercone, a działanie substancji odpowiednio oszacowane. Kryteria podjęcia decyzji o humanitarnym uśmierceniu zwierząt w stanie agonii lub silnie cierpiących można znaleźć w piśmiennictwie (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

#### 1.4. Opis metody badawczej

##### 1.4.1. Przygotowanie do badania *in vivo*

###### 1.4.1.1. Wybór gatunku badanego

Zalecanym gatunkiem jest królik albinotyczny; stosować należy zdrowe, młode dojrzałe króliki. W przypadku stosowania innych gatunków należy podać uzasadnienie.

#### 1.4.1.2. Przygotowanie zwierząt

Okolo 24 godziny przed nałożeniem substancji należy usunąć sierść przez krótkie strzyżenie części grzbietowej tułowia zwierząt. Należy zwrócić uwagę, by nie uszkodzić skóry; w badaniu mogą być stosowane jedynie zwierzęta ze zdrową, nienaruszoną skórą.

Niektóre odmiany królików posiadają pola gęstej sierści, które uwidaczniają się bardziej w niektórych porach roku. Takich pól z gęstą sierścią nie należy wybierać jako miejsca do przeprowadzenia badania.

#### 1.4.1.3. Warunki przebywania i karmienia zwierząt

Zwierzęta powinny być przetrzymywane pojedynczo. Temperatura w pomieszczeniu doświadczalnym dla królików powinna wynosić  $20 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50—60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody.

#### 1.4.2. Sposób postępowania

##### 1.4.2.1. Nanoszenie badanej substancji

Badana substancja powinna być наносzona na małą powierzchnię (około 6 cm<sup>2</sup>) skóry i przykryta płatkami gazy, umocowanym niedrażniącą taśmą. W przypadku gdy nie można nanosić substancji bezpośrednio (np. ciecz lub niektóre pasty), należy nanieść badaną substancję najpierw na płatek gazy i następnie nałożyć go na skórę. Płatek w czasie narażenia powinien być w swobodnym kontakcie ze skórą za pomocą odpowiedniego półprzepuszczalnego bandaża. Gdy badaną substancję наносzi się na płatek, należy go przenieść na skórę w taki sposób, by zapewnić dobry kontakt ze skórą i równomierne rozprowadzenie substancji na skórze. Należy zapobiec, by zwierzę nie miało dostępu do płatka i nie spożyło go lub nie wdychało badanej substancji.

Ciekłe substancje stosuje się z zasady jako nierozcieńczone. Gdy bada się substancje stałe (które mogą być w razie potrzeby sproszkowane), należy je zwilżyć najmniejszą ilością wody (lub w razie potrzeby innym odpowiednim nośnikiem) wystarczającą do zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. O ile stosuje się nośnik inny niż woda, to jego możliwy wpływ na drażnienie skóry przez badaną substancję powinien być minimalny, a najlepiej gdyby to działanie nie wystąpiło.

Po upływie okresu narażenia, w warunkach typowych po 4 godzinach należy usunąć pozostałości badanej substancji, najlepiej używając wody lub odpowiedniego rozpuszczalnika niezmiennego istniejącej reakcji lub integralności naskórka.

##### 1.4.2.2. Poziom dawkowania

Na badane miejsce nakłada się 0,5 ml cieczy względnie 0,5 g substancji stałej lub pasty.

#### 1.4.2.3. Badanie wstępne (badanie *in vivo* działania drażniącego/żrącego na skórę, na jednym zwierzęciu)

Stanowczo zaleca się, by badanie *in vivo* przeprowadzić wstępnie na jednym zwierzęciu, szczególnie, gdy przewiduje się, że substancja posiada właściwości żrące. Jest to zgodne ze strategią badania etapowego (zobacz Schemat).

Jeżeli na podstawie analizy wagi dowodów oceniono, że substancja działa żrąco, nie ma potrzeby przeprowadzenia dalszych badań na zwierzętach. Dla większości substancji podejrzanych o działanie żrące dalsze badania *in vivo* na ogół nie są potrzebne. W przypadkach gdy dodatkowe dane byłyby konieczne, ze względu na brak dostatecznych dowodów, można wykonać ograniczone badania na zwierzętach, stosując następujący sposób postępowania: наносzi się kolejno do trzech płatków na zwierzę. Pierwszy płatek usuwa się po trzech minutach. Gdy nie obserwuje się poważnych reakcji na skórze, наносzi się drugi płatek i usuwa po godzinie. Jeżeli obserwacje na tym etapie wskazują, że narażenie może być w sposób humanitarny przedłużone do czterech godzin, nakłada się trzeci płatek i usuwa go po czterech godzinach, a następnie ocenia się wynik badania.

Jeżeli obserwuje się działanie żrące po którymś z tych trzech etapów narażenia, doświadczenie należy natychmiast zakończyć. Jeżeli nie obserwuje się działania żrącego po usunięciu ostatniego płatka, zwierzę obserwuje się przez 14 dni, chyba że działanie żrące wystąpi wcześniej.

W przypadkach gdy nie przewiduje się działania żrącego badanej substancji, lecz działanie drażniące, nakłada się jeden płatek na jedno zwierzę na cztery godziny.

##### 1.4.2.4. Badanie potwierdzające (badanie działania drażniącego skórę *in vivo* na dodatkowych zwierzętach)

Gdy w badaniu wstępnym nie obserwuje się działania żrącego, to działanie drażniące lub brak takiego działania należy potwierdzić, używając do dwóch dodatkowych zwierząt, nakładając im po jednym płatku na cztery godziny. Gdy w badaniu wstępnym obserwowano działanie drażniące, badanie potwierdzające powinno się przeprowadzić w sposób etapowy lub narażać dwa dodatkowe zwierzęta równocześnie. W wyjątkowym przypadku, gdy nie prowadzi się badania wstępnego, na dwa lub trzy zwierzęta nakłada się po jednym płatku, które usuwa się po czterech godzinach. Gdy używa się dwóch zwierząt i oba wykazują taką samą reakcję, nie potrzeba dalszych badań. W innym przypadku należy zbadać również trzecie zwierzę. Dla oceny dwuznacznych reakcji potrzebne będzie użycie dodatkowych zwierząt.

##### 1.4.2.5. Okres obserwacji

Czas trwania obserwacji musi być wystarczający do pełnej oceny odwracalności obserwowanych skut-



ków. Doświadczenie należy zakończyć w momencie, gdy zwierzęta wykazują ciągłe oznaki silnego bólu lub ciężki stan. Dla ustalenia odwracalności skutków zwierzęta należy obserwować do 14 dni po usunięciu płatków. Gdy odwracalność widoczna jest przed 14 dniami doświadczenie należy zakończyć w tym czasie.

#### 1.4.2.6. Obserwacje kliniczne i stopniowanie oddziaływania na skórę

Wszystkie zwierzęta należy badać, zwracając uwagę na oznaki rumienia oraz obrzęku, a następnie należy ocenić reakcję wg skali punktowej po 60 minutach, a później po 24, 48 i 72 godzinach po usunięciu płatka. W badaniu wstępnym na jednym zwierzęciu należy sprawdzić miejsce nałożenia bezpośrednio po usunięciu płatka. Reakcje skórne należy ocenić wg skali punktowej i odnotować zgodnie z tabelą B.4.1. Jeżeli po 72 godzinach uszkodzenie skóry nie może być określone jako działanie drażniące lub żrące, to dla ustalenia odwracalności skutków obserwacje należy prowadzić do 14 dnia. W uzupełnieniu obserwacji działania drażniącego należy odnotować i dokładnie opisać wszystkie miejscowe skutki toksyczne, takie jak odftuszczenie skóry oraz jakiegokolwiek szkodliwe skutki działania ogólnego (np. kliniczne objawy toksyczne i wpływ na masę ciała). W celu wyjaśnienia dwuznacznych reakcji należy rozważyć przeprowadzenie badań histopatologicznych.

Ocena reakcji skóry wg skali punktowej jest z konieczności subiektywna. W celu ujednoczenia oceny reakcji skóry wg skali punktowej i wsparcia laboratoriów przeprowadzających doświadczenia w przeprowadzeniu i interpretacji obserwacji, personel przeprowadzający je należy odpowiednio przeszkolić w zakresie stosownego systemu punktowania (zobacz tabela poniżej). Dla stopniowania działania drażniącego na skórę lub innych uszkodzeń pomocne mogą być wszelkie ilustrowane przewodniki (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

## 2. WYNIKI

### 2.1. Przedstawienie wyników

W sprawozdaniu końcowym z badania wyniki należy zestawić w formie tabel i powinny one zawierać wszystkie pozycje wymienione w pkt 3.1.

### 2.2. Ocena wyników

Ocenę działania drażniącego na skórę należy oceniać w powiązaniu z charakterem i nasileniem uszkodzeń, ich odwracalnością lub brakiem odwracalności. Indywidualna punktacja nie prezentuje bezwzględnie standardu właściwości drażniących substancji, ponieważ inne skutki wywołane przez badany materiał są również brane pod uwagę. Natomiast indywidualna punktacja powinna być rozpatrywana jako wartość odniesienia, którą należy oceniać w połączeniu z wszystkimi innymi obserwacjami z tego badania.

W ocenie działania drażniącego należy brać pod uwagę odwracalność uszkodzeń skóry. Jeżeli takie re-

akcje jak tysienie (na ograniczonej powierzchni), nadmierne rogowacenie, przerosty i złuszczenie utrzymują się do końca 14-dniowego okresu obserwacji, to badaną substancję należy uznać za drażniącą.

## 3. SPRAWOZDANIE

### 3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje:

Racjonalne uzasadnienie do przeprowadzenia badania *in vivo*; analizę istniejących wyników badań, łącznie z wynikami strategii działania etapowego:

- opis istotnych wyników dostępnych z wcześniejszych badań,
- wyniki uzyskane na każdym etapie wynikające ze strategii badania,
- opis przeprowadzonych doświadczeń *in vitro*, łącznie ze szczegółami postępowania, wyniki uzyskane dla badanej substancji kontrolnej,
- analizę przeprowadzenia badania *in vivo*.

Badana substancja:

- dane identyfikacyjne (np. numer CAS; źródło otrzymania; znane zanieczyszczenia; numer serii),
- stan skupienia i właściwości fizykochemiczne (np. wartość pH, lotność, rozpuszczalność, trwałość),
- w przypadku mieszanin, skład i udział procentowy składników.

Nośnik:

- identyfikacja, stężenie (jeżeli dotyczy), stosowana objętość,
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Doświadczalne zwierzęta:

- stosowany gatunek/szczep, uzasadnienie w przypadku stosowania innych zwierząt niż króliki albinotyczne,
- liczba zwierząt każdej płci,
- masa każdego zwierzęcia na początku doświadczenia, po zakończeniu doświadczenia,
- wiek na początku doświadczenia,
- źródło pozyskania, warunki przebywania, pasza itp.

Warunki prowadzenia doświadczenia:

- technika przygotowania miejsca nakładania,
- szczegóły dotyczące materiału stosowanego na płatki i technika nakładania,
- szczegóły przygotowania substancji do badań, nakładanie i usuwanie.

Wyniki:

- zestawienie w tabelach wyników działania drażniącego/żrącego, indywidualnie dla każdego zwierzęcia, dla wszystkich okresów obserwacji,



- opis wszystkich obserwowanych uszkodzeń,
- słowny opis rodzaju i stopnia obserwowanego działania drażniącego lub żrącego, jak i wyniki badań histopatologicznych,
- opis jakichkolwiek innych skutków miejscowych (np. odtłuszczenie skóry) i skutków ogólnoustrojowych towarzyszących działaniu drażniącemu lub żrącemu.

Dyskusja wyników.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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. and 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**, 19—26.
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, 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., Esdail, D.J., Holzhtetter, 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.
- 6) Testing Method B. 40 Skin Corrosion.
- 7) 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://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 8) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 9) 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://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- 10) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

#### TABELA B.4.1: STOPNIOWANIE REAKCJI SKÓRY

##### Rumień i tworzenie się strupów

Brak rumienia	0
Rumień bardzo słaby (ledwo dostrzegalny)	1
Rumień dobrze zarysowany	2
Rumień umiarkowany do silnego	3
Silny rumień (czerwień buraczkowa) do powstawania strupów, przeszkadzających w stopniowaniu rumienia	4

Maksymalna możliwa liczba punktów: 4

##### Tworzenie się obrzęku

Brak obrzęku	0
Obrzęk bardzo słaby (ledwo dostrzegalny)	1
Obrzęk słaby (brzegi powierzchni dobrze zarysowane przez wyraźne wzniesienie)	2
Obrzęk umiarkowany (wzniesienie ok. 1 mm)	3
Obrzęk silny (wzniesienie ponad 1 mm i rozszerzony poza pole narażenia)	4

Maksymalna możliwa liczba punktów: 4

W celu wyjaśnienia wątpliwych reakcji można przeprowadzić badania histopatologiczne.

## SCHEMAT

**Strategia etapowego badania działania drażniącego i żrącego na skórę****ROZWAŻANIA OGÓLNE**

Uwzględniając zarówno przesłanki naukowe, jak i dobro zwierząt, ważne jest, aby unikać niepotrzebnego stosowania zwierząt i zmniejszać liczbę badań, które mogłyby wywołać silne reakcje u zwierząt. Przed badaniem *in vivo* należy ocenić wszystkie istotne informacje o substancji dotyczące jej właściwości żrących i drażniących na skórę. Być może istnieją już wystarczające dowody do klasyfikacji badanej substancji pod kątem jej możliwego działania żrącego i drażniącego na skórę, bez potrzeby prowadzenia doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych. Dlatego stosowanie analizy wagi dowodów i strategii badania etapowego zminimalizuje potrzebę badania *in vivo* szczególnie gdy substancja prawdopodobnie spowoduje silną reakcję.

W celu zdecydowania, o potrzebie przeprowadzenia dodatkowego badania, innego niż badania skórne *in vivo*, by móc scharakteryzować takie możliwości, zaleca się stosowanie analizy wagi dowodów na podstawie istniejących informacji dotyczących działania drażniącego i żrącego substancji na skórę. Gdy są potrzebne dalsze badania, zaleca się stosowanie strategii etapowego badania dla uzyskania istotnych wyników doświadczalnych. Dla substancji, które nie były dotąd badane, należy stosować strategię etapowego badania dla uzyskania wyników potrzebnych do oceny siły działania drażniącego/żrącego na skórę. Strategię badania, opisaną w tym Schemacie, wypracowano na warsztatach OECD (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa) oraz zatwierdzono i rozwinięto w Zharmonizowanym Integralnym Systemie Klasyfikacji Ryzyka Skutków Zdrowotnych dla Ludzi i Środowiska, zaaprobowanym na 28 Wspólnym Posiedzeniu Komitetu Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej ds. Substancji Chemicznych w listopadzie 1998 r. (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa).

Mimo że strategia etapowego badania nie stanowi integralnej części metody badawczej B.4, to wyraża zalecany sposób ustalania działania drażniącego/żrącego na skórę. To podejście przedstawia zarówno najlepszą praktykę, jak i etyczny wyznacznik dla badań działania drażniącego/żrącego na skórę *in vivo*. Metoda badawcza dostarcza wskazówek, jak prowadzić doświadczenie *in vivo*, i podsumowuje czynniki, które powinny być wykorzystane przed rozpoczęciem takiego badania. Strategia dostarcza sposób oceny istniejących danych o właściwościach drażniących/żrących badanej substancji na skórę i różnicowany sposób uzyskiwania znaczących danych o substancjach, dla których potrzebne są dodatkowe badania lub dla których nie przeprowadzono badań. Zaleca się również przeprowadzenie, sprawdzonymi i przyjętymi metodami *in vitro* lub *ex vivo*, badań działania drażniącego/żrącego na skórę w określonych przypadkach.

**OPIS STRATEGII BADAWCZEJ I OSZACOWANIA**

Przed rozpoczęciem doświadczenia jako części strategii badania etapowego (RYSUNEK) należy ocenić wszystkie dostępne informacje, dla określenia potrzeby badania skóry *in vivo*. Chociaż istotne informacje można uzyskać z oceny pojedynczych parametrów (np. skrajne wartości pH), to należy wziąć pod uwagę całość istniejących informacji. Należy ocenić na podstawie analizy wagi dowodów wszystkie znaczące dane o skutkach działania substancji lub jej analogów i przedstawić racjonalność decyzji. Główny nacisk należy położyć na istniejące dane dotyczące działania substancji na ludzi i zwierzęta, a następnie wyniki z badań *in vitro* lub *ex vivo*. Należy unikać w miarę możliwości badań działania żrącego substancji *in vivo*. Czynniki brane pod uwagę w strategii badania obejmują:

Ocena istniejących danych dotyczących działania substancji na ludzi i zwierzęta (Etap 1). W pierwszej kolejności należy brać pod uwagę istniejące dane dla ludzi, np. badania kliniczne lub zawodowe i sprawozdania z wypadków i/lub dane z badań przeprowadzonych na zwierzętach, np. badań toksykologicznych przy jednokrotnym lub powtarzanym narażeniu, gdyż dostarczają one bezpośrednich informacji o oddziaływaniu na skórę. Nie należy badać w teście *in vivo* substancji o znanym działaniu drażniącym lub żrącym i substancji, co, do których istnieją bezsporne dowody o braku ich działania drażniącego lub żrącego.

Analiza zależności aktywności od budowy substancji (SAR) (Etap 2). Jeżeli dostępne są wyniki badań substancji podobnych strukturalnie, to należy je wziąć pod uwagę. Jeżeli dostępna jest dostateczna liczba wyników dotyczących substancji o podobnej budowie lub mieszanin takich substancji wskazujących na ich możliwości działania drażniącego/żrącego na skórę dotyczących działania na ludzi i/lub zwierzęta, to można założyć, że oceniana substancja będzie wywoływała te same reakcje. W takich przypadkach nie ma potrzeby badania substancji. Wyniki negatywne z badań substancji o podobnej budowie lub mieszaniny takich substancji nie stanowią wystarczających dowodów na brak działania drażniącego/żrącego substancji w strategii etapowego badania. Sprawdzone i przyjęte sposoby z zastosowaniem analizy SAR mogą być stosowane do identyfikacji potencjału zarówno działania drażniącego, jak i żrącego na skórę.

Właściwości fizykochemiczne i reaktywność chemiczna (Etap 3). Substancje wykazujące skrajne wartości pH, takie jak  $\leq 2,0$  i  $\geq 11,5$ , mogą wykazywać silne działanie miejscowe. Jeżeli skrajne wartości pH są podstawą do zaklasyfikowania substancji jako żrącej w stosunku do skóry, to należy brać również pod uwagę jej rezerwę kwasową/zasadową (pojemność buforową) (zobacz pozycje 3 i 4 piśmiennictwa). Jeżeli z pojemności buforowej wynika, że substancja nie powinna działać żrąco na skórę, to należy podjąć dalsze badania dla potwierdzenia tego, najlepiej przy użyciu

sprawdzonej i przyjętej metody *in vitro* lub *ex vivo* (zobacz etapy: 5 i 6).

**Toksyczność skórna (Etap 4).** Gdy sprawdzono, że substancja chemiczna wykazuje działanie bardzo toksyczne w kontakcie ze skórą, to badanie *in vivo* działania drażniącego/żrącego może być niewykonalne, gdyż nakładana ilość badanej substancji może przekroczyć najwyższą dawkę toksyczną i wywołać w konsekwencji zgon lub silny ból u zwierząt. Poza tym, gdy badanie toksyczności ostrej skórnej na królikach albinotycznych prowadzone było z graniczną dawką toksyczną, wynoszącą 2000 mg/kg m.c. lub więcej, i nie obserwowano podrażnienia skóry lub działania żrącego, to nie ma potrzeby dodatkowego badania działania drażniącego/żrącego na skórę. Oceniając wcześniej przeprowadzone badanie toksyczności ostrej po naniesieniu na skórę, należy mieć na uwadze szereg okoliczności. Mogą być na przykład podane w sprawozdaniu niekompletne informacje o uszkodzeniu skóry. Doświadczenia i obserwacje mogły być przeprowadzone na innym gatunku zwierząt niż króliki, którego wrażliwość na reakcje mogła się znacznie różnić. Może również forma badanej substancji, nanoszonej na skórę zwierzęcia, nie była odpowiednia dla oszacowania działania drażniącego/żrącego na skórę (np. rozcieńczenie substancji w badaniu toksyczności skórnej) (zobacz pozycja 5 piśmiennictwa). Jednak w takich przypadkach, gdy dobrze zaplanowane i przeprowadzone badania toksyczności skórnej przeprowadzono na królikach, to negatywne wyniki mogą być przyjęte jako wystarczający dowód, że substancja nie działa żrąco lub drażniąco.

**Wyniki z badań *in vitro* i *ex vivo* (Etap 5 i 6).** Substancje, które wykazały właściwości żrące lub silnie drażniące w badaniu przeprowadzonym sprawdzoną i przyjętą metodą *in vitro* i *ex vivo* (zobacz pozycje 6 i 7 piśmiennictwa) przeznaczoną do oszacowania tych specyficznych skutków, nie muszą być badane na zwierzętach. Można przypuszczać, że substancje takie będą wywoływały podobnie silne skutki w badaniu *in vivo*.

**Badanie *in vivo* na królikach (Etap 7 i 8).** Gdy na podstawie wagi dowodów podejmuje się decyzję o przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*, to należy rozpocząć od badania wstępnego, używając jednego zwierzęcia. Gdy wynik tego doświadczenia wskazuje, że substancja działa żrąco na skórę, to nie należy prowadzić dalszego badania. Gdy w badaniu wstępnym

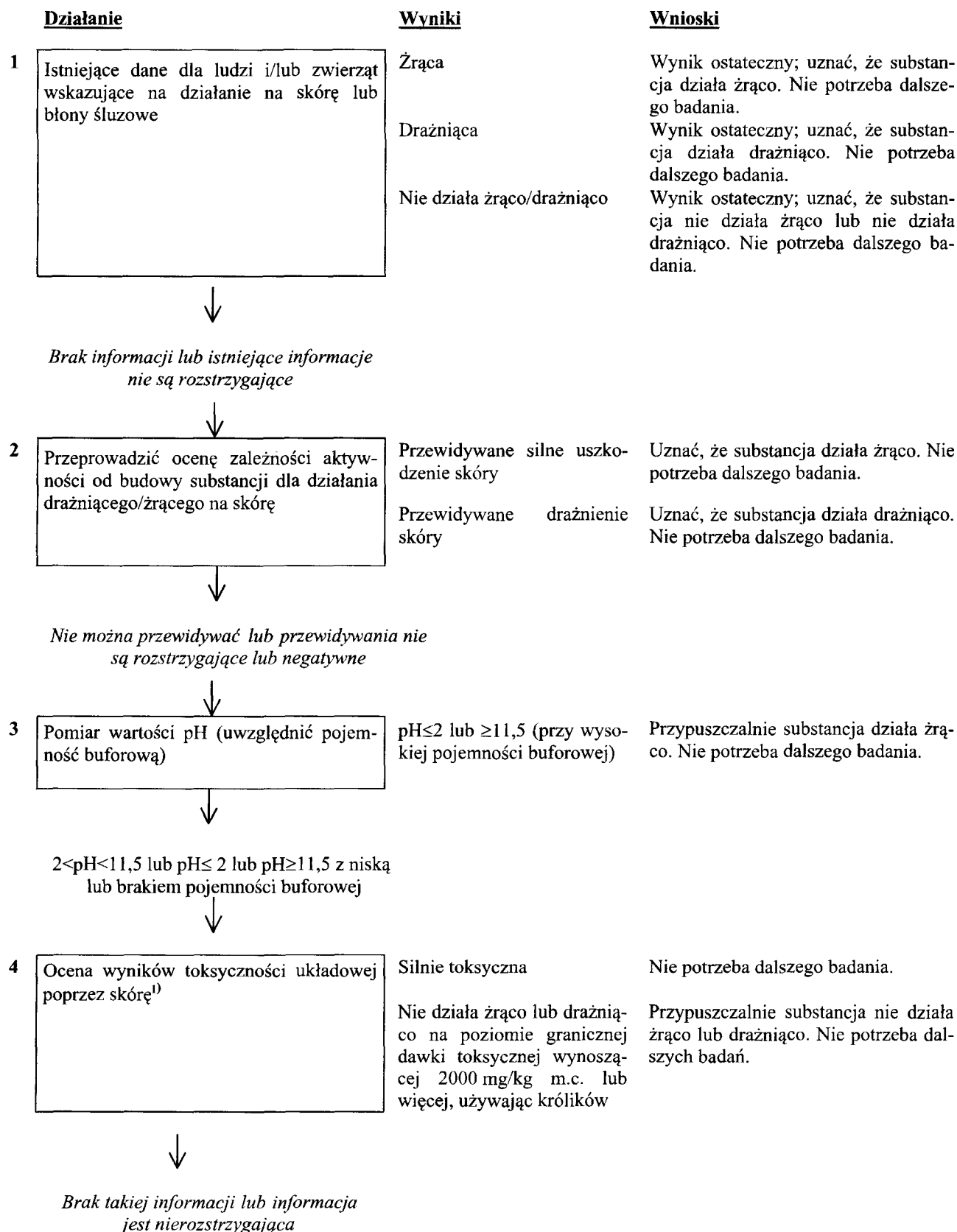
nie obserwuje się działania żrącego, to działanie drażniące lub jego brak należy potwierdzić, używając do dwóch dodatkowych zwierząt, narażając je przez cztery godziny. Gdy w badaniu wstępnym obserwuje się działanie drażniące, to badanie potwierdzające prowadzi się etapowo lub narażając dwa dodatkowe zwierzęta równocześnie.

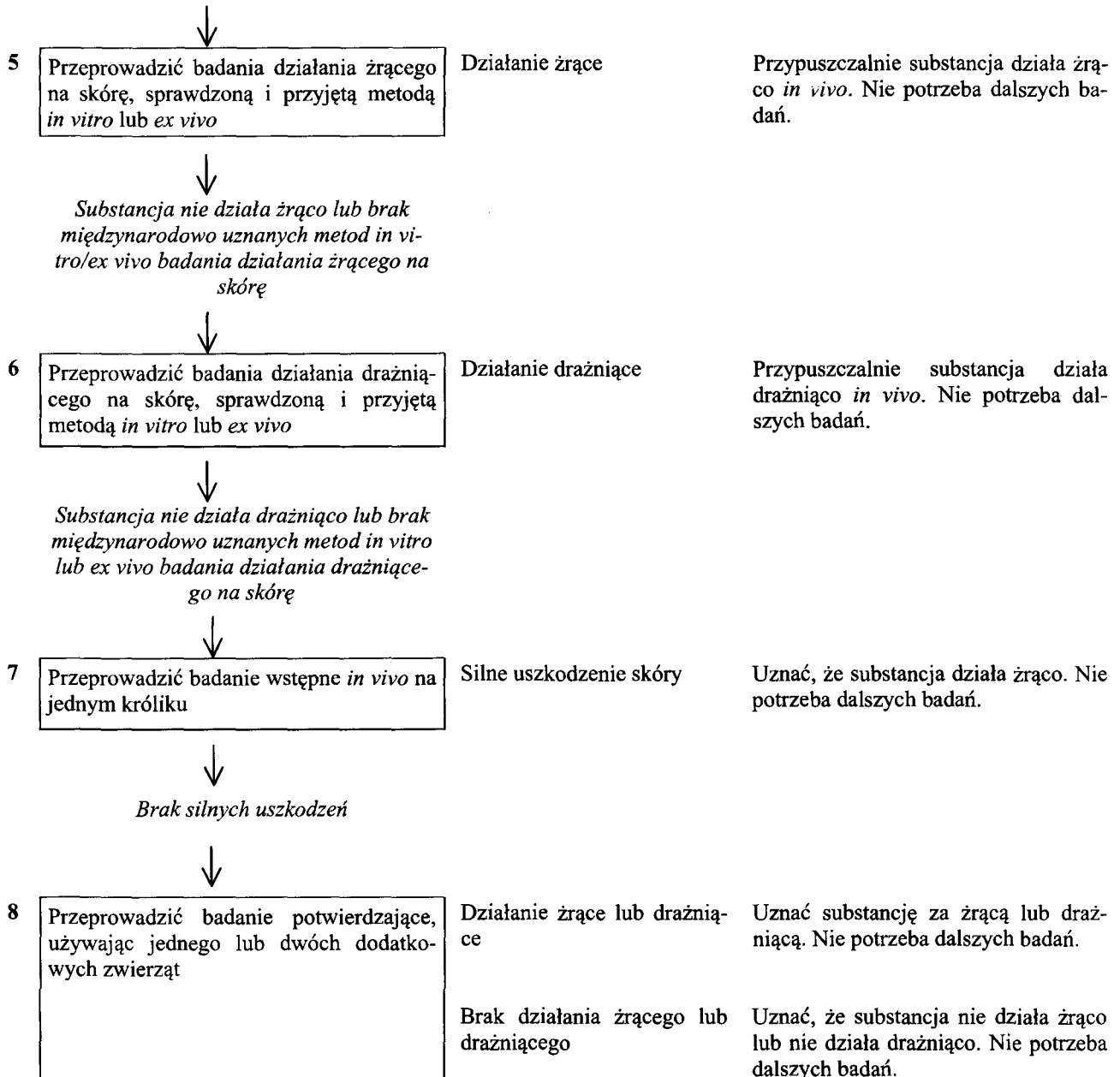
## PIŚMIENNICTWO

- 1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998). Harmonized Intergrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and 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., Esdail, D.J., Liebsch, M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA **26**, 709—720.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1998). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, **2** (1) pp. 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, 411—436.
- 6) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhtuter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro test for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro **12**, pp. 483—524.

## RYSUNEK B.4.1.

## STRATEGIA BADANIA I OCENY DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO/ŻRĄCEGO NA SKÓRĘ





<sup>1)</sup> Można wziąć pod uwagę przed krokiem 2 i 3.

## B.5. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA: DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE/ŻRĄCE NA OKO

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 405 (2002).

#### 1.1. Wstęp

Podczas opracowywania niniejszej metody szczególną uwagę zwrócono na możliwość jej ulepszenia, biorąc pod uwagę dobro zwierząt i oszacowanie wszystkich istniejących informacji dotyczących badanej substancji w celu uniknięcia zbędnych badań na zwierzętach laboratoryjnych. W metodzie tej zaleca się przed podjęciem badania *in vivo* działania drażniącego/żrącego badanej substancji na oczy wykonanie oceny wagi dowodów istniejących danych (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Jeżeli są dostępne niepełne dane, to mogą być one uzupełnione przez zastosowanie badania sekwencyjnego (zobacz pozycje 2 i 3 piśmiennictwa). Strategia badawcza zawiera wykonanie zwalidowanych i akceptowanych badań *in vitro*, a przedstawiona jest ona w Schemacie załączonym do niniejszej metody. Ponadto, w celu przewidzenia działania żrącego na oczy, przed podjęciem badania *in vivo* na oku zaleca się wziąć pod uwagę wyniki badań *in vivo* toksyczności ostrej skórnej, działania drażniącego/żrącego na skórę.

Uwzględniając zarówno przesłanki naukowe, jak i dobro zwierząt nie należy wykonywać badań *in vivo*, aż do momentu oceny, w wyniku analizy wagi dowodów, wszystkich dostępnych, istotnych danych dotyczących potencjału działania drażniącego/żrącego substancji na oczy. Dane takie powinny zawierać dowody pochodzące z istniejących badań u ludzi i/lub przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych, dowody na działanie drażniące/żrące jednej lub kilku substancji o podobnej strukturze lub mieszanin takich substancji, informacje o silnie kwaśnym lub zasadowym odczynie tej substancji (zobacz pozycje 4 i 5 piśmiennictwa) i wyniki zwalidowanych i akceptowanych badań *in vitro* lub *ex vivo* działania drażniącego lub żrącego na skórę (zobacz pozycje 6 i 7 piśmiennictwa). Analiza ta powinna ograniczyć potrzebę badania działania drażniącego/żrącego substancji w teście *in vivo*, dla których istnieją już wystarczające dowody z innych badań dla tych dwóch typów uszkodzeń. Badania te powinny być prowadzone przed, lub jako wynik, analizy wagi dowodów.

Dla pewnych substancji taka analiza może wskazywać na potrzebę przeprowadzenia badań *in vivo* potencjału działania drażniącego/żrącego substancji na oczy. We wszystkich takich przypadkach przed podjęciem decyzji o przeprowadzeniu takiego badania preferowane jest wykonanie badania działania drażniącego/żrącego na skórę (*in vivo*) oraz ocena wyników badania zgodnie z metodą badawczą B.4 (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Zastosowanie analizy wagi dowodów i strategii badania etapowego powinno zmniejszyć

potrzebę przeprowadzania badania działania drażniącego/żrącego na oczy (*in vivo*) dla substancji, dla której istnieją już wystarczające dowody z innych badań, że posiada takie właściwości. W przypadku gdy nie można określić potencjału działania drażniącego lub żrącego na oczy za pomocą strategii badania etapowego, pomimo przeprowadzonego badania działania żrącego i drażniącego na skórę (*in vivo*), można przeprowadzić badanie działania drażniącego/żrącego na oczy (*in vivo*).

Zalecana strategia badania etapowego, obejmująca przeprowadzenie badań działania żrącego/drażniącego za pomocą zwalidowanych i akceptowanych metod *in vitro* lub *ex vivo* jest dołączona w formie Schematu stanowiącego dodatek do niniejszej metody. Strategia ta została opracowana i jednomyślnie zalecona przez uczestników warsztatów OECD (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa) oraz przyjęta jako zalecana strategia badawcza w Światowym Systemie Zharmonizowanym (GHS) (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa). Zaleca się, by ww. strategia badawcza była podjęta przed wykonaniem badania *in vivo*. W celu uzyskania danych o przesłankach naukowych dotyczących działania drażniącego/żrącego substancji dla nowych substancji zaleca się sposób badania etapowego. Dla substancji istniejących o niewystarczających danych dotyczących działania drażniącego/żrącego na skórę strategię tę należy stosować dla uzupełnienia brakujących danych. Zastosowanie innej strategii badawczej lub sposobu postępowania bądź też podjęcie decyzji o niestosowaniu etapowego sposobu badania musi być uzasadnione.

#### 1.2. Definicje

**Działanie drażniące na oczy:** jest to wywoływanie zmian w oku po podaniu badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni od podania.

**Działanie żrące na oczy:** jest to wywoływanie uszkodzenia tkanek oka lub poważnej fizycznej utraty zdolności widzenia, po podaniu badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni od podania.

#### 1.3. Zasada metody badawczej

Badaną substancję wprowadza się w pojedynczej dawce do jednego oka zwierzęcia doświadczalnego; drugie oko służy jako kontrolne. Stopień działania drażniącego/żrącego na oczy jest oceniany w skali punktowej na podstawie uszkodzeń rogówki, tęczówki i spojówki w ustalonych odstępach czasu. Dla uzyskania całkowitej oceny skutków należy również opisać inne skutki w oku i negatywne skutki ogólnoustrojowe. Czas trwania badania powinien być wystarczający dla oceny odwracalności lub nieodwracalności obserwowanych skutków.

Zwierzęta wykazujące ciągłe oznaki ciężkiego wstrząsu i/lub bólu na jakimkolwiek etapie badań muszą być w sposób humanitarny uśmiercone, a działania substancji odpowiednio oszacowane. Kryteria służące do podjęcia decyzji o humanitarnym zabiciu zwierząt umierających lub silnie cierpiących można odnaleźć w pozycji piśmiennictwa 11.

#### 1.4. Opis metody badawczej

##### 1.4.1. Przygotowanie do badania *in vivo*

###### 1.4.1.1. Wybór gatunku zwierząt

Zalecany gatunkiem jest królik albinotyczny; stosować należy zdrowe, młode dojrzałe króliki. W przypadku stosowania innych gatunków należy podać uzasadnienie.

###### 1.4.1.2. Przygotowanie zwierząt

Oczy każdego zwierzęcia wybranego wstępnie do badania należy sprawdzić 24 godziny przed rozpoczęciem doświadczenia. Nie należy używać zwierząt, u których stwierdza się objawy podrażnienia oczu, wady oczu lub istniejące wcześniej uszkodzenie rogówki.

###### 1.4.1.3. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Zwierzęta powinny być przetrzymywane pojedynczo. Temperatura w pomieszczeniu doświadczalnym dla królików powinna wynosić  $20 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50—60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody.

##### 1.4.2. Sposób postępowania

###### 1.4.2.1. Podawanie badanej substancji

Badaną substancję należy umieścić w worku spojówkowym jednego oka każdego zwierzęcia po łagodnym odsunięciu dolnej powieki od gałki ocznej. Następnie powieki należy łagodnie przytrzymać razem przez około jedną sekundę, by zapobiec stratom materiału. Drugie oko, które pozostaje nienarażone, służy jako kontrolne.

###### 1.4.2.2. Przepłukiwanie

Oczy zwierząt doświadczalnych nie należy przemywać przez 24 godziny po wprowadzeniu badanej substancji, z wyjątkiem substancji stałych (patrz pkt 1.4.2.3.2) i w przypadku bezpośredniego działania żrącego lub drażniącego. Po 24 godzinach można stosować przemycie, jeśli jest to potrzebne.

Nie zaleca się stosowania dodatkowej grupy zwierząt celem zbadania wpływu przemywania, dopóki nie jest to naukowo umotywowane. Gdy potrzebna jest

dodatkowa grupa, należy użyć dwóch królików. Należy starannie udokumentować warunki przemywania, np. moment przemywania, skład i temperatura cieczy do przemywania, czas trwania przemywania, objętość stosowanej cieczy i szybkość przemywania.

###### 1.4.2.3. Poziom dawkowania

###### 1.4.2.3.1. Badanie cieczy

W przypadku badania cieczy stosuje się ją w ilości 0,1 ml. Badanej substancji nie należy bezpośrednio wprowadzać do oka za pomocą pulweryzatora. Należy ją najpierw przenieść do naczynia, a następnie wkropić do oka w ilości 0,1 ml.

###### 1.4.2.3.2. Badanie substancji stałych

W badaniu substancji w stanie stałym, past i substancji sypkich stosowana ilość powinna mieć objętość 0,1 ml lub masę nie większą niż 100 mg. Substancję należy rozetrzeć na drobny pył. Objętość substancji stałej należy mierzyć po delikatnym jej zagęszczeniu, np. przez stukanie pojemnikiem. O ile badana substancja w postaci stałej nie zostanie wydalona z oka zwierzęcia za pomocą odruchu fizjologicznego do pierwszego punktu odczytu, tj. jednej godziny po podaniu, oko należy przepłukać fizjologicznym roztworem soli lub wodą destylowaną.

###### 1.4.2.3.3. Badanie aerozoli

Zaleca się, aby substancje z pojemników zaopatrzonych w pulweryzatory oraz z aerozoli zebrać przed wprowadzeniem do oka. Jedyny wyjątek stanowią substancje znajdujące się w ciśnieniowych pojemnikach aerozolowych, które nie mogą być zbierane ze względu na odparowanie. W takich przypadkach oko należy trzymać otwarte i badaną substancję wprowadzić na przednią część oka z odległości 10 cm pojedynczym strzyknięciem trwającym około jednej sekundy. Odległość ta może ulec zmianie w zależności od ciśnienia w pojemniku i jego zawartości. Należy zwracać uwagę, by nie uszkodzić oka płynem z rozpylacza. W stosownych przypadkach może zająć konieczność oceny możliwości „mechanicznego” uszkodzenia oka spowodowanego silnym działaniem strumienia.

Dawkę aerozolu można ustalić, symulując doświadczenie w następujący sposób: substancję rozpyla się na zważony papier wielkości oka królika. Przyrost masy papieru odpowiada w przybliżeniu ilości, która została wprowadzona do oka. Dla substancji lotnych dawkę można ustalić na podstawie masy pojemnika przed i po użyciu.

###### 1.4.2.4. Badanie wstępne (badanie działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo* na jednym zwierzęciu)

Jak przedstawiono w strategii badania sekwencyjnego (zobacz Schemat 1) stanowczo zaleca się, by badanie *in vivo* przeprowadzić wstępnie na jednym zwierzęciu.



O ile wyniki tego badania po zastosowaniu opisanej procedury wskazują, że substancja działa żrąco lub silnie drażniąco na oczy, to nie należy przeprowadzać dalszych badań dotyczących działania drażniącego na oczy.

#### 1.4.2.5. *Miejscowe znieczulenie*

Miejscowe znieczulenie należy stosować w określonych przypadkach. Jeżeli analiza wagi dowodów wskazuje, że substancja może wywołać ból, lub wstępne badanie pokazuje, że następuje reakcja bólowa, to należy przed wprowadzeniem badanej substancji zastosować miejscowe znieczulenie. Należy starannie dobrać rodzaj, stężenie i dawkę substancji znieczulającej tak, aby zapewnić, że jej zastosowanie nie wywoła znaczących różnic w reakcji badanej substancji. W ten sam sposób należy znieczulić oko kontrolne.

#### 1.4.2.6. *Badanie potwierdzające (badanie działania drażniącego na oczy in vivo na dodatkowych zwierzętach)*

Gdy w badaniu wstępnym nie obserwuje się działania żrącego, to działanie drażniące lub brak takiego działania należy potwierdzić, używając w dalszych badaniach do dwóch dodatkowych zwierząt. Gdy w badaniu wstępnym obserwowano silne działanie drażniące, wskazujące na możliwy silny (nieodwracalny) skutek w badaniu potwierdzającym, zaleca się, by badanie potwierdzające prowadzić w sposób etapowy, każdorazowo raczej na jednym zwierzęciu, niż narażać dwa dodatkowe zwierzęta równocześnie. W przypadku gdy u drugiego zwierzęcia występują skutki działania żrącego lub silnie drażniącego, to doświadczenia nie należy kontynuować. W celu potwierdzenia słabych lub umiarkowanych objawów działania drażniącego potrzebne będą dodatkowe zwierzęta.

#### 1.4.2.7. *Okres obserwacji*

Czas trwania obserwacji musi być wystarczający do pełnej oceny wielkości i odwracalności obserwowanych skutków. Doświadczenie należy zakończyć w każdym momencie, gdy zwierzęta wykazują oznaki silnego bólu lub ciężki stan 9). Dla ustalenia odwracalności skutków zwierzęta należy obserwować do 21 dni od podania substancji. Gdy odwracalność widoczna jest przed upływem 21 dnia, doświadczenie należy zakończyć w tym czasie.

##### 1.4.2.7.1. *Obserwacje kliniczne i stopniowanie oddziaływania na oko*

Oczy powinny zostać zbadane po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin po podaniu substancji. Zaraz po uzyskaniu rozstrzygającej informacji uczestnictwo zwierząt w badaniu powinno trwać nie dłużej niż jest to konieczne. Zwierzęta objawiające ciągły silny ból lub ciężki stan powinny być bezzwłocznie w sposób humanitarny uśmiercone, a substancja odpowiednio oceniona. Zwierzęta należy w sposób humanitarny uśmiercić, jeżeli po wprowadzeniu badanej substancji do oka wystąpią następujące rodzaje jego uszko-

żenia: perforacja rogówki lub znaczące owrządzenie rogówki łącznie z garbiakiem rogówki, krew w przedniej komorze oka, 4 stopień nieprzezroczystości rogówki utrzymującej się przez 48 godzin, brak reakcji na światło (2 stopień reakcji tęczówki), utrzymujące się przez 72 godziny, owrządzenie błon spojówkowych, martwica błon spojówkowych lub mrużnych lub linienie. Tego typu uszkodzenia są zazwyczaj nieodwracalne.

Zwierzęta niewykazujące uszkodzeń oka należy zabijać nie wcześniej niż przed upływem 3 dni po wprowadzeniu substancji. Zwierzęta wykazujące łagodne lub umiarkowane uszkodzenia należy obserwować, dopóki zmiany się nie ustabilizują lub przez 21 dni, a po tym czasie zakończyć doświadczenie. Obserwacje należy przeprowadzać w 7, 14 i 21 dniu celem ustalenia stanu uszkodzeń i ich odwracalności lub braku odwracalności.

Stopnie uszkodzenia oka (rogówki, tęczówki i spojówki) należy zapisywać podczas każdego badania (Tabela B.5.1). Należy również zapisywać wszystkie inne uszkodzenia oka (np. łuszcza, zabarwienie) lub szkodliwe skutki ogólnoustrojowe.

Badanie reakcji można ułatwić, używając lupy binokularowej, ręcznej lampy szczelinowej, biomikroskopu lub innych odpowiednich przyrządów. Po zapisaniu obserwacji po 24 godzinach oczy można dalej badać przy pomocy fluoresceiny.

Ocena reakcji oczu wg skali punktowej jest z konieczności subiektywna. W celu ujednoczenia oceny reakcji oczu wg skali punktowej i wsparcia laboratoriów przeprowadzających doświadczenia w przeprowadzeniu i interpretacji obserwacji, personel je przeprowadzający należy odpowiednio przeszkolić w zakresie odpowiedniego systemu punktowania.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Ocena wyników

Punktową ocenę działania drażniącego na oczy należy oceniać w powiązaniu z charakterem i nasileniem uszkodzeń, ich odwracalnością lub brakiem odwracalności. Indywidualna punktacja nie prezentuje bezwzględnego standardu właściwości drażniących substancji. Należy również ocenić inne skutki wywołane przez badany materiał. Natomiast indywidualną punktację należy uważać jako wartość odniesienia i ma ona tylko wtedy znaczenie, gdy jest poparta pełnym opisem i oceną wszystkich obserwacji.

## 3. SPRAWOZDANIE

### 3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań musi zawierać następujące informacje:

Racjonalne uzasadnienie do przeprowadzenia badania *in vivo*; analizę istniejących wyników badań, łącznie z wynikami strategii działania etapowego:

- opis istotnych wyników dostępnych z wcześniejszych badań,
- wyniki uzyskane na każdym etapie wynikające ze strategii badania,
- opis przeprowadzonych doświadczeń *in vitro*, łącznie z szczegółami postępowania, wyniki uzyskane dla badanej substancji/referencyjnej,
- opis przeprowadzonego badania działania drażniącego/żrącego na skórę łącznie z otrzymanymi wynikami,
- analiza wagi dowodów dla przeprowadzonego doświadczenia *in vivo*.

#### Badana substancja:

- dane identyfikacyjne (np. numer CAS; źródło otrzymania; znane zanieczyszczenia; numer serii),
- stan skupienia i właściwości fizykochemiczne (np. wartość pH, lotność, rozpuszczalność, trwałość),
- w przypadku mieszanin skład i udział procentowy składników,
- jeżeli stosowano miejscowe znieczulenie, tożsamość środka, zanieczyszczenia, typ, dawka i potencjalne współdziałanie z badaną substancją.

#### Nośnik:

- identyfikacja, stężenie (o ile dotyczy), stosowana objętość,
- uzasadnienie wyboru nośnika.

#### Zwierzęta doświadczalne:

- stosowany gatunek/szczep, uzasadnienie w przypadku stosowania innych zwierząt niż króliki albinotyczne,
- wiek każdego zwierzęcia na początku doświadczenia,
- liczba zwierząt każdej płci w grupach narażanych i kontrolnych (o ile potrzebne),
- masa każdego zwierzęcia na początku i po zakończeniu doświadczenia,
- źródło pozyskania zwierząt, warunki przebywania, pasza itp.

#### Wyniki:

- opis metody stosowanej do oceny działania drażniącego w każdym czasie obserwacji (np. użycie ręcznej lampy szczelinowej, biomikroskopu, fluoresceiny),
- zestawienie w tabelach wyników działania drażniącego/żrącego dla każdego zwierzęcia z każdego czasu obserwacji, aż do usunięcia zwierzęcia z doświadczenia,

- słowny opis rodzaju i stopnia obserwowanego działania drażniącego lub żrącego,
- opis jakichkolwiek innych uszkodzeń obserwowanych w oku (np. unaczynienie, tworzenie się tłuszczki, zrosty, zabarwienia),
- opis miejscowych i układowych skutków szkodliwych innych niż związane z okiem i zmian histopatologicznych, o ile wystąpiły.

#### Dyskusja wyników.

### 3.2. Interpretacja wyników

Ekstrapolacja wyników z badania działania drażniącego na oczy u zwierząt laboratoryjnych na człowieka jest możliwa tylko w ograniczonym stopniu. W wielu przypadkach królik albinotyczny jest bardziej wrażliwy na działanie drażniące/żrące na oczy od człowieka.

Podczas interpretacji wyników należy zwrócić uwagę, by wykluczyć wyniki działania drażniącego spowodowanego wtórną infekcją.

### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Castroux, 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, 159—164.
- 3) Worth, A.P. and Fentem, J.H. (1999). A general approach for evaluating stepwise testing strategies. ATLA 27, 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 Substances Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 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, 227—231.
- 6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhtetter, 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.
- 7) Testing Method B. 40 Skin Corrosion.

- 8) Testing Method B.4. Acute toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
- 9) 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://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 10) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 11) 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://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

TABELA B.5.1: STOPNIOWANIE USZKODZENIA OKA

**Rogówka**

Zmętnienie: stopień gęstości (odczytuje się na obszarze największego nasilenia)\*)

Brak owrzdzenia i zmętnienia	0
Rozproszone lub rozsiane pola zmętnienia (inne niż nieznaczone zmatowienie normalnego blasku), szczegóły tęczówki wyraźnie widoczne	1
Łatwo dostrzegalne, przeświecające pola zmętnienia, szczegóły tęczówki nieznacznie zaciemnione	2
Zmętnione pola, szczegóły tęczówki niewidoczne, zarysy źrenicy ledwo dostrzegalne	3
Mętna rogówka, tęczówka niedostrzegalna przez zmętnienie	4

Maksymalna możliwa liczba punktów: 4

\* Należy zapisać wielkość pola zmętnienia rogówki.

**Tęczówka**

Normalna	0
Wyraźnie pogłębione fałdy, przekrwienie, obrzęk, umiarkowane przekrwienie okołorogówkowe lub nastrzyknięcia, tęczówka reaguje na światło (powolną reakcję należy uznać jako skutek działania)	1
Wylewy krwawe, silna destrukcja lub brak reakcji na światło	2

Maksymalna możliwa liczba punktów: 2

**Spojówka**

Zaczerwienienie (odnosi się do spojówki gałki ocznej i powiekowej, wyłączając rogówkę i tęczówkę) normalne	0
Część naczyń krwionośnych przekrwiona (nastrzyknięta)	1
Rozlane zaczerwienienie o barwie purpurowej, pojedyncze naczynia trudno dostrzegalne	2
Rozlane zaczerwienienie o barwie silnie czerwonej	3

Maksymalna możliwa liczba punktów: 3

**Obrzęk spojówki**

Obrzęk (odnosi się do powieki i/lub błon mrużnych)

Normalna	0
Jakikolwiek obrzęk powyżej normalnego	1
Wyraźny obrzęk z częściowym wywinięciem powiek	2
Obrzęk z połowicznym przymknięciem powiek	3
Obrzęk z powiekami przymkniętymi ponad połowę	4

Maksymalna możliwa liczba punktów: 4

## SCHEMAT

**Strategia etapowego badania działania drażniącego i żrącego na oczy****ROZWAŻANIA OGÓLNE**

Uwzględniając zarówno przesłanki naukowe, jak i dobro zwierząt, ważne jest, by unikać niepotrzebnego stosowania zwierząt i zmniejszać liczbę badań, które mogłyby wywołać silne reakcje u zwierząt. Przed badaniem *in vivo* należy ocenić wszystkie istotne informacje o substancji dotyczące jej właściwości żrących i drażniących na oczy. Być może istnieją już wystarczające dowody do klasyfikacji badanej substancji pod kątem jej możliwego działania drażniącego i żrącego na oczy, bez potrzeby prowadzenia doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych. Dlatego stosowanie analizy wagi dowodów i strategii badania etapowego zminimalizuje potrzebę badania *in vivo*, szczególnie gdy substancja prawdopodobnie spowoduje silną reakcję.

W celu zdecydowania o potrzebie przeprowadzenia dodatkowego badania innego niż badania oczu *in vivo*, by móc scharakteryzować takie działania, zaleca się stosowanie analizy wagi dowodów na podstawie istniejących informacji dotyczących działania drażniącego i żrącego substancji na oczy. Gdy są potrzebne dalsze badania, zaleca się stosowanie strategii badania etapowego dla uzyskania istotnych wyników doświadczalnych. Dla substancji, które nie były dotąd badane, należy stosować strategię etapowego badania dla uzyskania zestawu wyników potrzebnych do oceny siły działania drażniącego/żrącego na oko. Strategię badania opisaną w niniejszym Schemacie wypracowano na warsztatach OECD (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Była ona później zatwierdzona i rozwinięta w Zharmonizowanym Integralnym Systemie Klasyfikacji Ryzyka Skutków Zdrowotnych dla ludzi i dla środowiska wywołanego przez substancje chemiczne, zaaprobowanego na 28 Wspólnym Posiedzeniu Komitetu Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej d/s Substancji Chemicznych w listopadzie 1998 r. (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa).

Mimo że strategia badania etapowego nie stanowi integralnej części metody badawczej B.5, to wyraża zalecany sposób ustalania działania drażniącego/żrącego na oczy. To podejście przedstawia zarówno najlepszą praktykę, jak i etyczny wyznacznik dla badań działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo*. Metoda badawcza dostarcza wskazówek, jak prowadzić doświadczenie *in vivo* i podsumowuje czynniki, które powinny być wykorzystane przed rozpoczęciem takiego badania. Strategia badania etapowego dostarcza na podstawie wagi dowodów sposób na ocenę istniejących danych o właściwościach drażniących/żrących badanej substancji na oczy i różnicowany sposób uzyskiwania znaczących danych o substancjach, dla których potrzebne są dodatkowe badania lub dla których nie przeprowadzono badań. Strategia obejmuje przeprowadzenie najpierw sprawdzonymi i przyjętymi metodami *in vitro* lub *ex vivo* badań działania drażniącego/żrącego, a następnie metodą badawczą B.4 działania drażniącego/żrącego na skórę w określonych

przypadkach (zobacz pozycje 3 i 4 piśmiennictwa).  
**OPIS ETAPOWEJ STRATEGII BADAWCZEJ**

Przed rozpoczęciem doświadczeń jako części strategii badania etapowego (Rysunek B.5.1) należy ocenić wszystkie dostępne informacje, dla określenia potrzeby badania oka *in vivo*. Chociaż istotne informacje można uzyskać z oceny pojedynczych parametrów (np. skrajne wartości pH), należy ocenić całość istniejących informacji. Należy ocenić na podstawie analizy wagi dowodów wszystkie znaczące dane o skutkach działania substancji lub jej analogów strukturalnych i przedstawić uzasadnienie decyzji. Główny nacisk należy położyć na istniejące dane o substancji uzyskane dla ludzi i zwierząt, a następnie wyniki z badań *in vitro* lub *ex vivo*. Należy unikać w miarę możliwości badań działania żrącego substancji *in vivo*. Czynniki brane pod uwagę w strategii badania obejmują:

Ocena istniejących danych dotyczących działania substancji na ludzi i zwierzęta (Etap 1). W pierwszej kolejności należy brać pod uwagę istniejące dane dla ludzi, np. badania kliniczne lub zawodowe i sprawozdania z wypadków i/lub dane z badań przeprowadzonych na zwierzętach, gdyż dostarczają one bezpośrednich informacji o oddziaływaniu na oczy. Następnie należy ocenić dostępne dane z badań na ludziach i/lub zwierzętach dotyczące działania drażniącego/żrącego na skórę. Substancje o znanym silnym działaniu drażniącym lub żrącym na oczy, jak również substancje wykazujące działanie żrące lub silnie drażniące na skórę nie powinny być wkraplane do oka zwierzęcia; takie substancje należy uznać za żrące lub drażniące również na oczy. Nie należy badać w teście *in vivo* substancji o znanym działaniu drażniącym lub żrącym i substancji, co do których istnieją bezsporne dowody o braku ich działania drażniącego lub żrącego.

Analiza zależności aktywności od struktury substancji (SAR)(Etap 2). Jeżeli dostępne są wyniki badań substancji o podobnej strukturze, to należy je wziąć pod uwagę. Jeżeli dostępna jest dostateczna liczba wyników dotyczących substancji o podobnej budowie lub mieszanin takich substancji wskazujących na ich możliwości działania żrącego/drażniącego na oczy dotyczących działania na ludzi i/lub zwierzęta, to można założyć, że oceniana substancja będzie wywoływała te same reakcje. W takich przypadkach nie ma potrzeby badania substancji. Wyniki negatywne z badań substancji o podobnej budowie lub mieszanin takich substancji nie stanowią wystarczających dowodów na brak działania drażniącego/żrącego substancji w strategii etapowego badania. Sprawdzone i przyjęte sposoby z zastosowaniem analizy SAR mogą być stosowane do identyfikacji potencjału zarówno działania żrącego jak i drażniącego na oczy.

Właściwości fizykochemiczne i reaktywność chemiczna (Etap 3). Substancje wykazujące skrajne wartości pH, takie jak  $\leq 2,0$  i  $\geq 11,5$ , mogą wykazywać silne działanie miejscowe. Jeżeli skrajne wartości pH są podstawą do zaklasyfikowania substancji jako żrącej

w stosunku do skóry, to należy brać również pod uwagę jej rezerwę kwasową/zasadową (pojemność buforową) (zobacz pozycje 5 i 6 piśmiennictwa). Jeżeli z pojemności buforowej wynika, że substancja nie powinna działać żrąco na oczy, to należy podjąć dalsze badania dla potwierdzenia tego, najlepiej przy użyciu sprawdzonej i przyjętej metody *in vitro* lub *ex vivo* (zobacz etapy: 5 i 6).

Uwzględnianie innych istniejących informacji (Etap 4). Na tym etapie należy ocenić wszystkie dostępne informacje o toksyczności ogólnoustrojowej w narażeniu przez skórę. Należy również ocenić toksyczność ostrą po naniesieniu na skórę badanej substancji. O ile badana substancja okazała się wysoce toksyczna po podaniu na skórę, nie ma potrzeby badania jej na oczach. Chociaż zależność pomiędzy toksycznością ostrą skórną a działaniem żrącym/drażniącym na oczy niekoniecznie musi istnieć, to można przypuścić, że gdy jakaś substancja jest wysoce toksyczna poprzez skórę, wywoła również wysoką toksyczność po wprowadzeniu do oka. Takie dane powinny być brane również pod uwagę pomiędzy etapem 2 i 3.

Wyniki z badań *in vitro* lub *ex vivo* (Etap 5 i 6). Substancje, które wykazały w badaniu przeprowadzonym metodą *in vitro* lub *ex vivo* (zobacz pozycje 7 i 8 piśmiennictwa), która była sprawdzona i przyjęta do szacowania szczególnie działania drażniącego/żrącego na oczy lub skórę, działania silnie drażniące lub żrące nie muszą być badana na zwierzętach. Można przypuszczać, że substancje takie będą wywoływały podobnie silne skutki w badaniu *in vivo*. Gdy sprawdzone i przyjęte metody *in vitro/ex vivo* są niedostępne, należy ominąć etapy 5 i 6 oraz przejść wprost do etapu 7.

Oszacowanie *in vivo* działania drażniącego lub żrącego substancji na skórę (Etap 7). Gdy istniejące dowody nie stanowią wystarczającej podstawy do przeprowadzenia rozstrzygającej analizy wagi dowodów o potencjalnym działaniu żrącym/drażniącym na oczy przez daną substancję na bazie danych z badań wyszczególnionych powyżej, należy najpierw ocenić potencjalne działanie żrące/drażniące po naniesieniu na skórę *in vivo*, stosując metodę badawczą B.4 (zobacz pozycja 4 piśmiennictwa) i załączony do niej Schemat (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa). O ile substancja wykaże działanie żrące lub silnie drażniące na skórę, należy przyjąć, że działa żrąco na oczy, chyba że inne informacje skłonią do innego wniosku. Tak więc nie ma potrzeby przeprowadzenia badania oka *in vivo*. O ile substancja nie wykazuje działania żrącego lub silnie drażniącego na skórę należy przeprowadzić badanie oka *in vivo*.

Badanie *in vivo* na królikach (Etap 8 i 9). Badanie oka *in vivo* należy rozpocząć od badania wstępnego, używając jednego królika. O ile wyniki tego badania wskażą, że substancja działa silnie drażniąco lub żrąco na oczy, nie należy przeprowadzić dalszego badania. Jeżeli w badaniu tym nie wystąpią skutki działania żrącego lub silnie drażniącego, należy przeprowadzić badanie sprawdzające na dwóch dalszych zwierzętach.

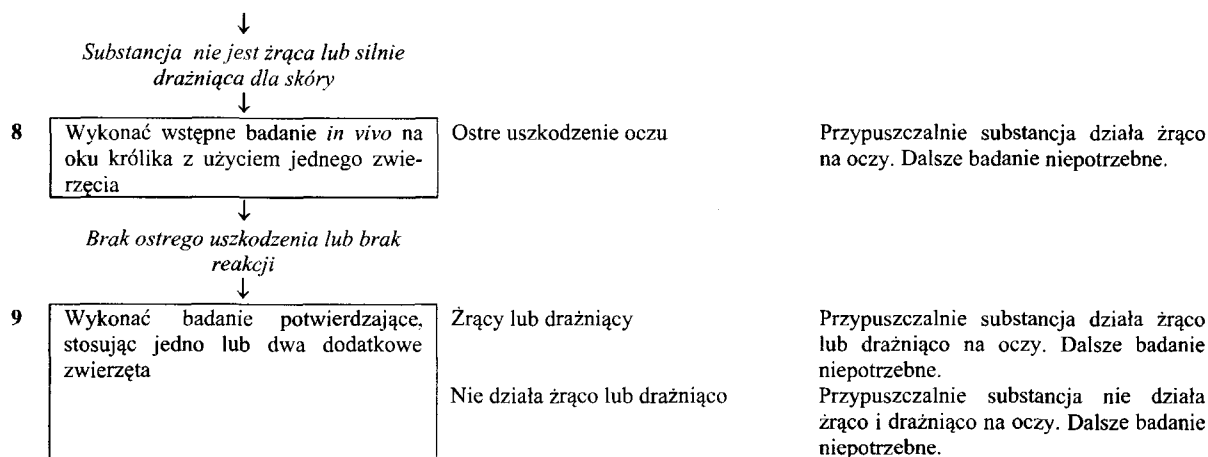
## PIŚMIENNICTWO

- 1) OECD (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998). Harmonized Intergrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P. and Fentem, J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161—177.
- 4) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
- 5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1998). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) pp. 19—26.
- 6) Neun, D.J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227—231.
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhtuter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* test for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro* 12, pp. 483—524.
- 8) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 9) Annex to testing Method B.4.: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

Rysunek B.5.1.

## STRATEGIA BADANIA I OCENY DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO/ŻRĄCEGO NA OCZY

	Działanie	Wyniki	Wnioski
1	<p>Istniejące dane dla ludzi i/lub zwierząt wykazujące działanie na oczy</p> <p>Istniejące dane dla ludzi i/lub zwierząt wykazujące działanie żrące na skórę</p> <p>Istniejące dane dla ludzi i/lub zwierząt wykazujące działanie silnie drażniące na skórę</p>	<p>Znaczne uszkodzenie oka</p> <p>Drażniący dla oczu</p> <p>Niedrażniący/nieżrący dla oczu</p> <p>Żrący dla skóry</p> <p>Silnie drażniący skórę</p>	<p>Wynik ostateczny. Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Wynik ostateczny. Przepuszczalnie substancja działa drażniąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Wynik ostateczny. Przepuszczalnie substancja nie działa żrąco i drażniąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Przepuszczalnie substancja działa drażniąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p>
	↓ <i>brak dostępnych informacji lub dostępne informacje niejednoznaczne</i>		
2	<p>Wykonać SAR dla drażnienia/działania żrącego dla oka.</p> <p>Wykonać SAR dla działania żrącego na skórę</p>	<p>Przewidywane znaczne uszkodzenie oka</p> <p>Przewidywane działanie drażniące na oczy</p> <p>Przewidywane działanie żrące dla skóry</p>	<p>Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Przepuszczalnie substancja działa drażniąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p> <p>Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.</p>
	↓ <i>Nie można nic przewidywać, przewidywania niejednoznaczne lub negatywne</i>		
3	Zmierzyć wartość pH (pojemność buforową, jeżeli to właściwe)	Wartość $pH \leq 2$ lub $\geq 11,5$ (z wysoką pojemnością buforową, jeżeli to właściwe)	Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.
	↓ <i><math>2 &lt; pH &lt; 11,5</math> lub <math>pH \leq 2,0</math> lub <math>\geq 11,5</math> z niską pojemnością buforową lub jej brakiem, jeżeli to właściwe</i>		
4	Oszacować toksyczność ogólnoustrojową przez narażenie po naniesieniu na skórę	Bardzo toksyczny w stężeniach, które byłyby badane na oku.	Substancja zbyt toksyczna do badania. Dalsze badanie niepotrzebne.
	↓ <i>Takie informacje niedostępne lub substancja nie jest bardzo toksyczna</i>		
5	Wykonać zwalidowane i zaakceptowane badanie <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i> na działanie żrące na oczy	Wynik badania – żrący	Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.
	↓ <i>Substancja nie jest żrąca lub zwalidowane metody badawcze <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i> nie są jeszcze dostępne</i>		
6	Wykonać badanie <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i> sprawdzoną i przyjętą, zwalidowaną metodą na działanie drażniące na oczy	Wynik badania – drażniący	Przepuszczalnie substancja działa drażniąco/żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.
	↓ <i>Substancja nie jest drażniąca lub zwalidowane metody badawcze <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i> nie są jeszcze dostępne</i>		
7	Doświadczalnie oszacować potencjał działania drażniącego/żrącego na skórę <i>in vivo</i> (zobacz metodę badawczą B.4 wraz ze Schematem)	Wynik badania – żrący lub silnie drażniący	Przepuszczalnie substancja działa żrąco na oczy. Dalsze badanie niepotrzebne.



## Załącznik nr 7

**B.31. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W ROZWOJU PRZEDPORODOWYM****1. METODA**

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 414 (2001).

**1.1. Wstęp**

Niniejsza metoda — badania toksyczności w rozwoju przedporodowym została opracowana w celu dostarczania ogólnych informacji dotyczących skutków narażenia w okresie przedporodowym na badane ciężarne zwierzę i płód rozwijający się w macicy. Mogą one zawierać ocenę skutków narażenia na matkę, a także padnięcie, nieprawidłowości strukturalne lub zaburzenia rozwoju płodu. Zaburzenia czynnościowe, chociaż są ważną częścią rozwoju, nie są brane pod uwagę w niniejszej metodzie. Można je oceniać w oddzielnych lub równoległe przeprowadzonych badaniach według metody dotyczącej neurotoksyczności w okresie rozwojowym. Informacji dotyczących badania zaburzeń czynnościowych i innych skutków poporodowych należy poszukiwać za pomocą metody badania toksyczności reprodukcyjnej w teście dwupokoleniowym oraz metody badania neurotoksyczności rozwojowej.

W niniejszej metodzie badawczej mogą być konieczne, w szczególnych przypadkach, modyfikacje w oparciu o określoną wiedzę, np. dotyczącą właściwości fizykochemicznych lub toksykologicznych badanej substancji. Takie modyfikacje są dopuszczalne, gdy przekonujące dowody naukowe sugerują, że modyfikacja będzie prowadzić do dostarczenia większej ilości danych wynikających z badania. W takim przypadku te naukowe dowody powinny być dokładnie przedstawione w sprawozdaniu końcowym z badania.

**1.2. DEFINICJE**

**Toksykologia rozwoju:** badania skutków działania szkodliwego na rozwijający się organizm, które mogą być następstwem narażenia przed zapłodnieniem,

podczas rozwoju przedporodowego lub w okresie poporodowym do czasu osiągnięcia dojrzałości płciowej. Do głównych objawów toksyczności rozwojowej zalicza się: 1) zgon, 2) nieprawidłowości budowy, 3) zaburzenia rozwoju i 4) zaburzenia czynnościowe. Toksykologia rozwoju była uprzednio często nazywana teratologią.

**Szkodliwe skutki:** jakiegokolwiek zmiany związane z narażeniem powodujące obniżenie zdolności organizmu do przeżywania, rozmnażania lub przystosowania się do środowiska. Biorąc pod uwagę toksykologię rozwoju rozumianą w najszerszym jej ujęciu, zalicza się tutaj każdy skutek, który zakłóca normalny rozwój zarodka zarówno przed, jak i po narodzinach.

**Zmieniony wzrost:** zmiana masy lub wielkości narządu lub ciała potomstwa.

**Zmiany (nieprawidłowości):** zmiany strukturalne w rozwoju, do których zalicza się zniekształcenia i zmienność (zobacz pozycja 28 piśmiennictwa):

**Zniekształcenie/nieprawidłowość większa:** zmiana strukturalna uważana za szkodliwą dla zwierzęcia (może być także śmiertelna) i jest zazwyczaj rzadka.

**Zmienność/nieprawidłowość mniejsza:** zmiana strukturalna uważana za mającą mały lub niemającą żadnego szkodliwego wpływu na zwierzę; może być przejściowa bądź stosunkowo często występować w populacji kontrolnej.

**Zarodek:** sumaryczne określenie wszystkich form pochodzących od zapłodnionego jaja w jakiegokolwiek fazie rozwoju od zapłodnienia aż do porodu, w tym błony zarodkowe, a także zarodek lub płód.

**Implantacja (zagnieżdżenie):** przyłączenie blastocysty do nabłonka macicy, w tym jej penetrację przez ten nabłonek i jej osadzenie w endometrium.



**Zarodek:** wczesna faza rozwojowa organizmu, w szczególności rozwijający się produkt zapłodnienia jaja po pojawieniu się osi podłużnej, aż do pojawienia się wszystkich głównych struktur.

**Embriotoksyczność:** szkodliwe działanie dla normalnej struktury, rozwoju, wzrostu i/lub żywotności zarodka.

**Płód:** nienarodzone potomstwo w okresie pozarodkowym.

**Toksyczność płodowa:** szkodliwe działanie dla normalnej struktury, rozwoju, wzrostu i/lub żywotności płodu.

**Poronienie:** przedwczesne wydalenie z macicy produktu zapłodnienia: zarodka lub płodu niezdolnego do życia.

**Resorpcja:** zarodek, który po zagnieżdżeniu w macicy obumarł i jest lub został wchłonięty:

**Resorpcja wczesna:** dowód zagnieżdżenia bez rozpoznawalnego zarodka/płodu.

**Resorpcja późna:** martwy zarodek lub płód z zewnętrznymi zmianami zwyrodnieniowymi.

**NOAEL:** skrót dla poziomu dawkowania bez obserwowanego szkodliwego skutku, jest to najwyższy poziom dawki, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków związanych z narażeniem.

### 1.3. Substancja kontrolna

Brak.

### 1.4. Zasada metody badawczej

Badana substancja podawana jest zwierzętom będącym w ciąży przynajmniej od momentu zagnieżdżenia do jednego dnia przed planowanym uśmierceniem, które powinno nastąpić, w miarę możliwości, jak najbliższej dnia normalnego porodu, bez ryzykowania utraty danych wynikających z porodu przedwczesnego. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona, w celu badania jedynie okresu organogenezy (np.: 5—15 dzień u gryzoni i 6—18 dzień u królika), ale także w przypadku gdy to właściwe, również skutków narażenia z okresu przed zagnieżdżeniem przez cały okres ciąży, aż do dnia przed cięciem cesarskim. Tuż przed cesarskim cięciem samice są uśmiercane, zawartość macicy przebadana, a płody ocenione pod względem widocznych zmian zewnętrznych, szkieletowych oraz w tkankach miękkich.

### 1.5. Opis metody badawczej

#### 1.5.1. Wybór gatunku zwierząt

Zaleca się, by badanie było wykonane na najbardziej odpowiednim gatunku, a stosowane powinny być gatunki i rasy zwierząt laboratoryjnych używanych powszechnie w badaniach toksyczności w roz-

woju przedporodowym. Zalecany gatunkiem wśród gryzoni jest szczur, a z pozostałych zwierząt królik. W przypadku, użycia innego gatunku zwierzęcia należy podać uzasadnienie.

#### 1.5.2. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22\pm 3$  °C dla gryzoni i  $18\pm 3$  °C dla królików. Wilgotność względna powinna wynosić 50—60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody.

Kojarzenie w pary powinno być przeprowadzone w klatkach odpowiednich do tych celów. Preferowane jest przetrzymywanie pojedynczych osobników, ale dopuszczalne jest także przetrzymywanie osobników w małych grupach.

#### 1.5.3. Przygotowanie zwierząt

Powinny być stosowane zdrowe zwierzęta, aklimatyzowane przynajmniej przez 5 dni do warunków laboratoryjnych i nieużywane wcześniej w innych doświadczeniach. Powinny być znane: rasa, źródła pochodzenia, płeć, waga i/lub wiek zwierząt. Zwierzęta wszystkich grup badanych powinny być, na ile to możliwe, w tym samym wieku i mieć taką samą masę ciała. Na każdym poziomie dawkowania stosuje się młode dorosłe dziewicze samice. Samice powinny być kojarzone z samcami tego samego gatunku i rasy, należy unikać kojarzenia osobników spokrewnionych. W przypadku gryzoni zerowym dniem ciąży jest ten, w którym zaobserwuje się czop pochwoy i/lub nasienie; w przypadku królików dniem zerowym jest zazwyczaj dzień pokrycia lub sztucznej inseminacji, jeżeli taka technika jest stosowana. Klatki należy ustawić w taki sposób, by zminimalizować możliwy wpływ ich ustawienia na wyniki badania. Każdemu zwierzęciu należy przypisać jego własny numer identyfikacyjny. Samice powinny być przypisane do grupy kontrolnej i grup narażanych w sposób losowy. Jeżeli samice były kojarzone grupowo, to zwierzęta z każdej partii powinny zostać równomiernie rozdzielone pomiędzy grupy. Podobnie samice inseminowane przez tego samego samca powinny być równomiernie rozdzielone pomiędzy grupy.

### 1.6. Sposób postępowania

#### 1.6.1. Liczba i płeć zwierząt

Każda grupa kontrolna i badana powinna zawierać wystarczającą liczbę samic, by uzyskać w przybliżeniu 20 samic z miejscami zagnieżdżenia podczas autopsji. Grupy z mniej niż 16 zwierzętami z miejscami zagnieżdżenia mogą być nieodpowiednie. Występująca śmiertelność osobników rodzicielskich nie musi być przyczyną unieważnienia badania, pod warunkiem że nie przekracza 10 %.

### 1.6.2. Przygotowanie dawek

Jeżeli stosowany jest nośnik lub inny dodatkowy związek umożliwiający podawanie substancji, to należy brać pod uwagę jego następujące charakterystyczne cechy: wpływ na absorpcję, rozmieszczenie, metabolizm i retencję lub wydalanie badanej substancji; wpływ na właściwości chemiczne badanej substancji, które mogą zmienić jej charakterystykę toksykologiczną; wpływ na spożywanie pokarmu i pobieranie wody przez zwierzęta. Nośnik nie powinien być ani toksyczny dla rozwoju, ani nie może mieć wpływu na rozrodczość.

### 1.6.3. Podawanie substancji

W zasadzie badana substancja powinna być podawana codziennie od zagnieżdżenia (np. 5 dnia po skojarzeniu) do dnia przed planowanym porodem za pomocą cesarskiego cięcia. W przypadku gdy dostępne są wyniki badania wstępnego, które nie wskazują na wysoki potencjał strat przed zagnieżdżeniem, to podawanie substancji może być przedłużone na cały okres ciąży, od dnia skojarzenia do dnia przed planowanym uśmierceniem. Ogólnie wiadomo jest, że niewłaściwe obchodzenie się ze zwierzętami lub stres podczas ciąży może powodować poronienia. Aby zapobiec poronieniom spowodowanym przez czynniki niezwiązane z podawaną substancją, należy unikać niepotrzebnego zakłócania spokoju ciężarnych samic, a także stresu spowodowanego przez czynniki zewnętrzne takie jak hałas.

Należy stosować przynajmniej trzy poziomy dawek i równoległą grupę kontrolę. Zdrowe zwierzęta powinny zostać przypisane do grup narażanych i kontrolnych w sposób losowy. Poziomy dawki powinny zostać ustalone tak, by spowodować stopniowanie skutków toksycznych. Najwyższa dawka powinna zostać dobrana w taki sposób, by indukować toksyczność rozwojową i/lub objawy toksyczne u samic (objawy kliniczne lub spadek masy ciała), ale nie ich zgon bądź poważne cierpienie, chyba że jest to ograniczone właściwościami fizykochemicznymi lub właściwościami biologicznymi badanej substancji. Przynajmniej jedna dawka pośrednia powinna powodować minimalne skutki toksyczne możliwe do zaobserwowania. Najniższa dawka nie powinna powodować jakiegokolwiek toksyczności rozwojowej lub toksyczności dla osobników rodzicielskich. Sekwencja malejących dawek powinna zostać dobrana tak, by można było wykazać odpowiedź typu dawka-skutek i wyznaczyć poziom bez obserwowanego szkodliwego skutku (NOAEL). Optymalne dla ustalenia sekwencji malejących dawek są współczynniki o wartości 2–4, a często dodanie czwartej badanej grupy jest lepsze niż stosowanie bardzo dużych współczynników pomiędzy dawkami (np. większych niż 10). Chociaż celem jest ustalenie wartości NOAEL dla matek, to badania, w których nie ustalono takiego poziomu, również są możliwe do zaakceptowania (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa).

Poziomy dawek powinny zostać ustalone z uwzględnieniem istniejące danych o toksyczności, a także informacji dodatkowych na temat metaboli-

zmu i toksykokinetyki badanej substancji lub substancji podobnych strukturalnie. Informacje te pomogą w doborze właściwego sposobu dawkowania.

Równolegle należy stosować grupę kontrolną. Tej grupie podaje się placebo lub nośnik, jeżeli taki jest stosowany podczas podawania substancji. Wszystkie grupy powinny otrzymywać taką samą objętość badanej substancji lub nośnika. Ze zwierzętami w grupach kontrolnych należy obchodzić się w taki sam sposób, jak ze zwierzętami narażanymi. Grupy kontrolne z nośnikiem powinny otrzymywać nośnik w najwyższej zastosowanej ilości (jak w grupie o najniższej stosowanej dawce).

### 1.6.4. Badanie dawki granicznej

Jeżeli badanie w jednej dawce na poziomie przynajmniej 1000 mg/kg masy ciała/dzień po podaniu dożołądkowym i przy zastosowaniu procedur opisanych w niniejszej metodzie nie powoduje powstawania możliwych do zaobserwowania skutków toksycznych i jeżeli nie należało się spodziewać takich skutków na podstawie istniejących danych (np. w przypadku związków strukturalnie i/lub metabolicznie podobnych) to wtedy pełne badanie z trzema poziomami dawek może być uważane za niepotrzebne. Spodziewane narażenie ludzi może wskazywać na potrzebę zastosowania wyższej dawki stosowanej dożołądkowo w badaniu stężeń granicznych. W przypadku innych sposobów podawania, takich jak inhalacyjne bądź skórne, właściwości fizykochemiczne badanej substancji często mogą wskazywać na maksymalny możliwy do uzyskania poziom narażenia (np. zastosowanie po naniesieniu na skórę nie powinno powodować ostrej toksyczności miejscowej).

### 1.6.5. Podawanie substancji

Badana substancja lub nośnik są zazwyczaj podawane dożołądkowo za pomocą sondy dożołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Jeżeli stosowany jest inny sposób podawania, to należy podać jego uzasadnienie; konieczne mogą być wtedy pewne modyfikacje (zobacz pozycje 2, 3 i 4 piśmiennictwa). Badana substancja powinna być podawana codziennie, w przybliżeniu o tej samej porze dnia.

Dawka dla każdego zwierzęcia powinna opierać się na najbardziej aktualnych pomiarach masy ciała osobnika. Należy być jednakże ostrożnym w dostosowywaniu dawki w ostatnim trymestrze ciąży. Do wyboru dawki stosowane powinny być istniejące dane, by zapobiec nadmiernej toksyczności dla osobnika macierzystego. Jeżeli jednak takie objawy toksyczności pojawiają się, to zwierzęta te powinny zostać w sposób humanitarny uśmiercone. Jeżeli objawy takie pojawiają się u kilku ciężarnych samic z narażanej grupy, to należy wziąć pod uwagę zakończenie doświadczenia z tą grupą. Gdy substancja podawana jest przez zgłębnik, to powinna być podawana w pojedynczej dawce przy pomocy sondy dożołądkowej lub kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość, jaka może zostać podana jednorazowo zwierzęciu, zależy od jego rozmiarów. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy cia-

ła, z wyjątkiem przypadku roztworów wodnych gdzie stosowane może być 2 ml/100 g masy ciała. Jeżeli jako nośnik stosuje się olej kukurydziany, to objętość nie powinna przekraczać 0,4 ml/100 g masy ciała. Zmienność objętości powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia tak, aby zapewnić stałą objętość na wszystkich poziomach dawek.

#### 1.6.6. Obserwacje samic ciężarnych

Obserwacje kliniczne powinny być dokonywane, a wyniki zapisywane przynajmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze dnia, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych skutków po podawaniu substancji. Kondycja zwierząt powinna być opisywana z uwzględnieniem śmiertelności, stanów agonalnych, stałych zmian w zachowaniu i wszystkich innych objawów wyraźnej toksyczności.

#### 1.6.7. Masa ciała i spożycie pokarmu

Zwierzęta powinny być ważone w dniu zerowym lub nie później niż w trzecim dniu (zwierzęta po skojarzeniu dostarczone przez dostawcę zewnętrznego), następnie pierwszego dnia narażenia i przynajmniej co trzy dni podczas okresu podawania substancji oraz w dniu przewidywanego uśmiercenia.

Spożycie pokarmu powinno być zapisywane w odstępach trzydniowych i zbiegać się w czasie z pomiarami masy ciała.

#### 1.6.8. Badanie sekcyjne

Samice powinny zostać uśmiercone na dzień przed przewidywanym porodem. Samice wykazujące objawy poronienia lub przedwczesnego porodu przed zaplanowanym uśmierceniem powinny zostać uśmiercone i poddane dokładnym oględzinom makroskopowym.

W czasie zakończenia doświadczenia lub zgonu podczas doświadczenia samice powinny zostać przebadane makroskopowo pod kątem nieprawidłowości w budowie i zmian patologicznych. W celu uniknięcia zasugerowania wyniku, badania samic podczas cięcia cesarskiego oraz płodów powinny być wykonane bez wiedzy o tym, z jakiej grupy one pochodzą.

#### 1.6.9. Badanie zawartości macicy

Natychmiast po zakończeniu porodu lub tuż po śmierci macice powinny być usunięte, a stopień zaawansowania ciąży określony. Macice, których wygląd nie wskazuje na ciążę, powinny zostać poddane dalszym badaniom (np. barwienie siarczkiem amonu u gryzoni i barwienie Salewskiego lub inną odpowiednią metodą dla królików), by potwierdzić brak ciąży (zobacz pozycja 5 piśmiennictwa).

Należy zważyć macice samic ciężarnych wraz z szyjką macicy. Nie należy zapisywać masy macic samic ciężarnych uzyskanych od zwierząt, które padły podczas doświadczenia.

U zwierząt ciężarnych należy określić liczbę ciałek żółtych.

Zawartość macicy powinna zostać przebadana pod kątem liczby martwych zarodków lub płodów oraz płodów żywych. W celu oszacowania względnego czasu śmierci zarodka należy opisać stopień resorpcji (zobacz pkt 1.2).

#### 1.6.10. Badanie płodów

Należy określić płeć i masę ciała każdego płodu.

U każdego płodu powinny zostać przebadane zmiany zewnętrzne (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa).

Należy przebadać płody pod kątem zmian w szkieletcie i tkankach miękkich (np. zmiany, zniekształcenia i nieprawidłowości) (zobacz pozycje 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 i 24 piśmiennictwa). Pożądana, ale niewymagana jest kategoryzacja zmian płodowych. Jeżeli jednak jest ona wykonywana, to należy wyraźnie podać kryteria definicji każdej kategorii. Szczególną uwagę należy zwrócić na układ rozrodczy, który powinien zostać przebadany pod kątem zmian w rozwoju.

W przypadku gryzoni około połowa miotów powinna być przebadana pod kątem zmian szkieletowych. Pozostała część powinna być przebadana pod względem zmian w tkankach miękkich przy zastosowaniu uznanych właściwych metod serii przekrojów lub techniki przekrojów całościowych.

W przypadku zwierząt innych niż gryzonie, np.: króliki, wszystkie płody powinny zostać przebadane pod względem zmian w szkieletcie jak i tkankach miękkich. Ciała tych płodów powinny być ocenione przez sekcję pod kątem zmian w tkankach miękkich, do czego zalicza się również procedury do dalszego szacowania wewnętrznej struktury serca (zobacz pozycja 25 piśmiennictwa). Głowy połowy płodów przebadanych w ten sposób powinny zostać oddzielone i poddane badaniom pod względem zmian w tkankach miękkich (oczy, mózg, komory nosowe i język) przy zastosowaniu standardowych metod serii przekrojów (zobacz pozycja 26 piśmiennictwa) lub innych równie czułych metod. Ciała tych płodów i pozostałe nienaruszone płody powinny zostać przebadane pod względem zmian w szkieletcie przy zastosowaniu tych samych metod, jak opisane dla gryzoni.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Opracowanie wyników

Dane powinny być zapisywane oddzielnie dla każdej samicy, jak i jej potomstwa i zestawione w formie tabel. Należy wykazać dla każdej badanej grupy i każdego pokolenia liczbę zwierząt na początku doświadczenia, liczbę zwierząt martwych podczas badania lub uśmierconych z powodów humanitarnych, czas zgonu lub uśmiercenia, liczbę samic w ciąży, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis zaobserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich poja-

wienia się, trwanie i nasilenie objawów, rodzaje obserwacji zarodków/płodów i wszystkie inne znaczące dane dotyczące płodów.

Dane liczbowe powinny być oszacowane właściwą metodą statystyczną. Każdy płód należy traktować w analizie danych jako jednostkę. Stosowane powinny być ogólnie uznane metody statystyczne; wybrane jako część składowa układu doświadczenia, a ich wybór powinien być uzasadniony. Dane zwierząt, które nie przeżyły do planowanego uśmiercenia, także powinny być podane. Mogą one również być uwzględnione w obliczonych wartościach średnich z każdej grupy. Znaczenie takich wyników oraz ich uwzględnienie bądź też nieuwzględnienie w średnich dla grup(y) w każdym przypadku powinno być oszacowane i uzasadnione.

## 2.2. Ocena wyników

Obserwacje poczynione w przeprowadzonym badaniu toksyczności rozwoju przedporodowego powinny być ocenione pod względem zaobserwowanych skutków. Ocena ta powinna zawierać następujące informacje:

- wyniki badania zarodków/płodów i samic w tym ocena powiązań lub ich brak pomiędzy narażeniem zwierząt badanych na badaną substancję oraz występowaniem i nasileniem wszystkich obserwacji,
- kryteria stosowane w kategoryzacji zmian zewnętrznych, tkanek miękkich i szkieletu płodów, jeżeli dokonano takiej kategoryzacji,
- w celu wspomżenia interpretacji danych z doświadczenia, dane z wcześniej przeprowadzonych badań jako dane kontrolne, jeżeli jest to właściwe,
- dane liczbowe stosowane w obliczaniu wszystkich wartości procentowych i odpowiednich współczynników,
- odpowiednią analizę statystyczną uzyskanych wyników, w tym wystarczające informacje na temat metody analizy tak, aby niezależny recenzent/statystyk mógł ponownie dokonać obliczeń i odtworzyć analizę.

W badaniach, które wykazują brak objawów działania toksycznego, pod uwagę należy brać dalsze badania dotyczące absorpcji i biodostępności badanej substancji.

## 2.3. Interpretacja wyników

Badanie toksyczności w rozwoju przedporodowym dostarcza informacji na temat skutków działania toksycznego na samice i wewnątrzmaciczny rozwój ich potomstwa powtarzanego podawania drogą pokarmową substancji w czasie ciąży. Wyniki badań powinny być interpretowane w połączeniu z wynikami z badań podprzewlekłych, rozmnażania, toksykokinetycznych i innych. Ponieważ nacisk położony jest zarówno na toksyczność ogólną, jak i rozwojową, to wy-

niki badania pozwalają na rozróżnienie pomiędzy skutkami rozwojowymi następującymi przy niewystąpieniu toksyczności ogólnej i tymi, które występują tylko w warunkach narażenia na dawki toksyczne dla zwierząt rodzicielskich.

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- stan fizyczny i gdy to ma znaczenie również właściwości fizykochemiczne,
- identyfikacja, w tym numer CAS, jeżeli jest znany/ustalony,
- czystość.

Nośnik (jeżeli był stosowany):

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli został zastosowany inny nośnik niż woda.

Badane zwierzęta:

- gatunek/szczep,
- liczba i wiek zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasza itp.,
- masy poszczególnych zwierząt na początku doświadczenia.

Warunki badania:

- uzasadnienie wybranych dawek,
- szczegóły dotyczące formulacji badanej substancji, w tym przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie, trwałość i jednorodność preparatu,
- szczegóły dotyczące podawania badanej substancji,
- przeliczenie stężenia (ppm) badanej substancji z zawartości w paszy/wodzie pitnej na dawkę rzeczywistą (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli istnieje taka konieczność,
- warunki środowiskowe,
- szczegóły dotyczące paszy i wody pitnej.

Wyniki:

Dane o toksyczności dla samic według dawki powinny zawierać, ale nie ograniczać się do:

- liczby zwierząt na początku doświadczenia, liczby zwierząt przeżywających badanie, liczby zwierząt ciężarnych, liczby poronień i przedwczesnych porodów,

- dni padnięć podczas badania i liczby zwierząt, które przeżyły do końca badania,
- danych zwierząt, które nie przeżyły do końca badania, powinny być podane, ale nie należy ich uwzględniać w statystycznych porównaniach pomiędzy grupami,
- dnia zaobserwowania każdego nietypowego objawu klinicznego i jego następstw,
- masy ciała, zmiany masy ciała i masy macicy samicy ciężarnej, w tym opcjonalnie zmiany masy ciała skorygowanej o masę macicy samicy ciężarnej,
- spożycia paszy i, jeżeli mierzone, spożycie wody,
- wyników z sekcji, w tym masy macicy,
- wartości NOAEL dla skutków działania na osobniki pokolenia rodzicielskiego i dla skutków działania na rozwój.

Rozwojowe wartości końcowe według dawki dla samic z zagnieżdzeniami:

- liczba ciałek żółtych,
- liczba zagnieżdżeń, liczba i procent martwych i żywych płodów i resorpcji,
- liczba i procent poronień przed i po zagnieżdzeniu.

Rozwojowe wartości końcowe według dawki dla samic z żywymi płodami:

- liczba i wartości procentowe dla żywego potomstwa,
- stosunek płci,
- masa ciała płodów najlepiej zebrana według płci,
- zniekształcenia zewnętrzne, tkanki miękkiej i szkieletu oraz inne ważne zmiany,
- kryteria kategoryzacji, jeżeli została ona zastosowana,
- całkowita liczba i wartości procentowe dla płodów i matek z jakimikolwiek zmianami zewnętrznymi, zmianami tkanki miękkiej i szkieletu, a także rodzaje i występowanie poszczególnych nieprawidłowości i inne ważne zmiany.

Omówienie wyników.

Wnioski.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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 Anal.* 16, 399—400.
- 2) Kimmel, C.A., Fransic, E.Z. (1990). Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* 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 EPA (1985) Subpart E — Specific Organ Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- 5) Salewski E. (1964). Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Nauyn-Schmeidebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol.* 247, 367.
- 6) Edwards J.A. (1968). The External Development of the Rabbit and Rat Embryo. In: *Adv. Teratol.* 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. *Congen. Anom.* 16, 171—173.
- 8) Igarashi E. et al. (1992). Frequency of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Fetuses. *Congen. Anom.* 32, 381—391.
- 9) Kimmel C.A. et al. (1993). Skeletal Developmental Following Heat Exposure in 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., Taylor W.J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses. *J. Morphol.* 127, 291—306.
- 12) Fritz H. (1974). Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Fetal Maturity, *Teratology* 11, 313—320.
- 13) Gibson J.P. et al. (1966). Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 398—408.
- 14) Kimmel C.A., 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 Fetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to *Teratology Workshop Manual*, pp. 163—173.

- 17) Spark C. 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. *Am. J. Anat.* **41**, 411—445.
- 18) Staples R.E. Schnell V.L. (1964). Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technol.* **39**, 61—63.
- 19) Strong R.M. (1928). The Order, Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus norvegicus albinus*) Skeleton. *Am. J. Anat.* **36**, 313—355.
- 20) Stuckhardt J.L. and Poppe S.M. (1984). Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Fetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **4**, 181—188.
- 21) Walker D.G. 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*, J.G. Wilson and J. Warkany (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 Fetuses. *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 Fetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* (eds. D. Neubert, H.J. Merker and T.E. Kwasigroch). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126—144.
- 27) US EPA (1991). Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Fed. 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.

Załącznik nr 8

### B.35. DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ROZRODCZOŚĆ W WARUNKACH TESTU DWUPOKOLENIOWEGO

#### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 416 (2001).

##### 1.1. Wstęp

Niniejsza metoda — działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu dwupokoleniowego — została opracowana w celu dostarczenia ogólnych informacji dotyczących wpływu badanej substancji na nie naruszalność i wydajność układów rozrodczych samca i samicy, w tym na funkcjonowanie gonad, cykl rujowy, zachowanie w czasie kojarzenia, zapłodnienie, ciążę, poród, laktację i odsadzanie oraz rozwój i wzrost potomstwa. Badania mogą także dostarczyć informacji o wpływie badanej substancji na zachorowalność noworodków, śmiertelność w okresie neonatalnym, wstępnych danych o przedporodowym i poporodowym działaniu toksycznym. Wyniki uzyskane w przedstawnym badaniu mogą służyć jako wskazówki dla następnych badań. Oprócz badania wzrostu i rozwoju pokolenia F1 dzięki niniejszej metodzie można także ocenić integralność i wydajność układów rozrodczych samców i samic, a także wzrost i rozwój pokolenia F2. Dalsze informacje o działaniu toksycznym na rozwój płodu i zaburzeniach czynnościowych mogą być uzyskane w badaniach dodatkowych do badania zaprezentowanego w niniejszej metodzie przy zastosowaniu metody dla toksyczności rozwojowej i/lub neuro-

toksyczności rozwojowej, bądź też mogą być one częścią osobnych badań z użyciem odpowiednich metod badawczych.

##### 1.2. Zasada metody badawczej

Badana substancja podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. W celu wywołania jakichkolwiek szkodliwych skutków dla spermatogenezy samce pokolenia P powinny otrzymywać badaną substancję w okresie wzrostu i przynajmniej przez jeden pełny cykl spermatogenetyczny (w przybliżeniu 56 dni u myszy i 70 dni u szczura). Działanie na nasienie jest oceniane z wykorzystaniem kilku parametrów (np. morfologia nasienia i jego ruchliwość) oraz w badaniach histopatologicznych. Jeżeli dostępne są archiwalne dane o spermatogenezie pochodzące z poprzednio przeprowadzonych badań o wystarczającym okresie powtarzanego narażenia, np. badanie 90-dniowe, to samce pokolenia P nie muszą być uwzględniane w szacowaniu. Zaleca się jednakże, aby próbki lub zapisy cyfrowe dotyczące nasienia pokolenia P były zachowane tak, by umożliwić ich późniejsze oszacowanie. Samice pokolenia P powinny otrzymywać badaną substancję w okresie wzrostu i przez kilka pełnych cykli rujowych tak, aby wykryć jakikolwiek szkodliwy wpływ tej substancji na cykl rujowy. Badaną substancję podaje się zwierzętom rodzicielskim (P) podczas ich kojarzenia, podczas ciąży i do odsadzenia potomstwa F1. Po odsadzeniu podawanie

substancji pokoleniu F1 kontynuuje się w okresie ich wzrostu, aż do osiągnięcia dojrzałości, w okresie kojarzenia i do uzyskania potomstwa — pokolenia F2 a następnie aż do usamodzielnienia pokolenia F2.

Obserwacje kliniczne i badania patologiczne prowadzi się u wszystkich zwierząt pod kątem objawów działania toksycznego ze zwróceniem szczególnej uwagi na skutki wskazujące na zaburzenia budowy i czynności układów rozrodczych samic i samców oraz na wzrost i rozwój potomstwa.

### 1.3. Opis metody badawczej

#### 1.3.1. Wybór gatunku zwierząt

Zalecanym gatunkiem jest szczur. Jeżeli stosowany jest inny gatunek zwierzęcia, to należy to uzasadnić. W takiej sytuacji konieczne wówczas będą pewne modyfikacje badania. W badaniu nie powinny być stosowane rasy charakteryzujące się niską płodnością lub dobrze znaną wysoką częstotliwością występowania wad rozwojowych. Na początku badania różnica w masie ciała badanych zwierząt powinna być jak najmniejsza i nie powinna przekraczać 20 % średniej masy ciała każdej z płci.

#### 1.3.2. Warunki przetrzymywania i karmienie

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50—60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody. Wybór paszy może zależeć od konieczności zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji, jeżeli jest ona podawana tą metodą.

Zwierzęta mogą być przetrzymywane pojedynczo lub w małych grupach tej samej płci. Kojarzenie powinno odbywać się w klatkach przystosowanych do tych celów. Po kopulacji skojarzone samice powinny być przetrzymywane pojedynczo w klatkach przystosowanych do porodu i macierzyństwa. Skojarzone szczury mogą także być trzymane w małych grupach i rozdzielone na jeden lub dwa dni przed porodem. Skojarzonym zwierzętom należy dostarczyć odpowiedni materiał do budowy gniazda, gdy okres porodu jest bliski.

#### 1.3.3. Przygotowanie zwierząt

Stosowane powinny być zdrowe zwierzęta aklimatyzowane przynajmniej przez 5 dni do warunków laboratoryjnych i nieużywane wcześniej w innych doświadczeniach. Powinny być znane: gatunek, szczep, źródło pochodzenia, płeć, masa ciała i/lub wiek. Pokrewieństwa pomiędzy zwierzętami powinny być znane tak, by uniknąć krzyżowania zwierząt spokrewnionych. Zwierzęta przypisuje się losowo do grupy kontrolnej i grupy narażanej (zalecany jest dobór według masy ciała).

Klatki należy ustawić w taki sposób, by zminimalizować możliwy wpływ ich ustawienia na wyniki badania. Każdemu zwierzęciu należy przypisać jego własny numer identyfikacyjny. Dla pokolenia P należy to uczynić przed rozpoczęciem podawania substancji. W przypadku pokolenia F1 należy to uczynić przy odsadzaniu zwierząt, które zostały wybrane do kojarzenia. Zapisy wskazujące na pochodzenie miotu powinny być zachowane dla wszystkich wybranych zwierząt pokolenia F1. Ponadto tak szybko, jak to jest możliwe, po porodzie w przypadku, gdy bierze się pod uwagę badania czynnościowe lub ważenie poszczególnych osobników, zaleca się identyfikację osobników młodych.

Zwierzęta rodzicielskie (P) w momencie rozpoczęcia podawania badanej substancji powinny być w wieku 5 do 9 tygodni. Zwierzęta ze wszystkich grup badanych powinny, na tyle, na ile to możliwe, być w tym samym wieku i mieć taką samą masę ciała.

### 1.4. Sposób postępowania

#### 1.4.1. Liczba i płeć zwierząt

Każda grupa narażana i kontrolna powinna składać się z odpowiedniej liczby zwierząt, tj. powinna liczyć nie mniej niż 20 samic ciężarnych lub bliskich porodu. W przypadku substancji powodujących niektóre niepożądane skutki związane z narażeniem (np. sterylność lub nadmierna toksyczność w przypadku stosowania wysokich dawek) spełnienie tego warunku może być niemożliwe. Celem jest uzyskanie takiej ilości ciężarnych samic, by zapewnić odpowiednie oszacowanie potencjału substancji w zakresie wpływu na płodność, ciążę, zachowanie osobników rodzicielskich i osesków oraz wzrost i rozwój potomstwa F1 od zapłodnienia do osiągnięcia dojrzałości oraz rozwój ich potomstwa (F2) do momentu odsadzenia. Dlatego też brak pożądanej ilości samic w ciąży (tj. 20) nie zawsze oznacza unieważnienie badania, a każdy przypadek powinien być oceniany indywidualnie.

#### 1.4.2. Przygotowanie substancji w określonych dawkach

Zaleca się, by substancję podawać drogą pokarmową (z pokarmem, wodą pitną lub za pomocą sondy), chyba że inna droga podawania wydaje się bardziej właściwa.

Jeżeli jest to konieczne, to badana substancja powinna być rozpuszczana lub zawieszana w odpowiednim nośniku. Zaleca się, o ile jest to możliwe, stosowanie w pierwszej kolejności roztworów/zawiesin wodnych, a w następnej kolejności roztworów/emulsji olejowych (w oleju kukurydzianym) i w końcu innych nośników. W przypadku stosowania nośników innych niż woda powinny być znane ich właściwości toksykologiczne. Należy określić trwałość badanej substancji w nośniku.

#### 1.4.3. Dawkowanie

Należy stosować przynajmniej trzy poziomy dawkę i równoległą kontrolę. Najwyższa dawka powinna



być dobrana w taki sposób, by wywołać działanie toksyczne, ale nie powodować śmierci lub cierpienia zwierząt, chyba że jest to ograniczone właściwościami fizykochemicznymi lub skutkami biologicznymi badanej substancji. W przypadku niespodziewanej śmiertelności wynoszącej w przybliżeniu mniej niż 10 % w pokoleniu zwierząt rodzicielskich (P) badanie w dalszym ciągu możliwe jest do zaakceptowania. Sekwencja malejących dawek powinna zostać dobrana tak, by można było wykazać odpowiedź typu dawka-skutek i wyznaczyć poziom bez obserwowanego skutku szkodliwego (NOAEL). Optymalne dla ustalenia sekwencji malejących dawek są współczynniki o wartości od 2—4, a często dodanie czwartej badanej grupy jest lepsze niż stosowanie bardzo dużych współczynników pomiędzy dawkami (np. większych niż 10). W przypadku badań drogą pokarmową odstęp pomiędzy dawkami nie powinien być większy niż 3. Poziomy dawek powinny zostać ustalone z uwzględnieniem istniejących danych o toksyczności, a także informacji dodatkowych na temat metabolizmu i toksykokinetyki badanej substancji lub substancji o podobnej strukturze. Informacje te pomogą w doborze właściwego sposobu dawkowania.

Równolegle należy stosować grupę kontrolną. Tej grupie podaje się placebo lub nośnik, jeżeli taki jest stosowany podczas podawania substancji. Wszystkie grupy powinny otrzymywać taką samą objętość badanej substancji lub nośnika. Ze zwierzętami w grupach kontrolnych należy obchodzić się w taki sam sposób, jak ze zwierzętami narażanymi. Grupy kontrolne z nośnikiem powinny otrzymywać ten nośnik w najwyższej z zastosowanych objętości. Jeżeli badana substancja podawana w paszy powoduje zmniejszenie pobierania lub wykorzystania paszy, to pod uwagę może być brana konieczność zastosowania pary grup kontrolnych. Zamiast pary grup kontrolnych można wykorzystać dane z kontrolowanych badań szacujących skutki obniżonego spożycia pokarmu na parametry rozmnażania.

Należy brać pod uwagę następujące cechy charakterystyczne nośnika i innych dodatków: wpływy na absorpcję, rozmieszczenie, metabolizm lub retencję badanej substancji; wpływy na własności chemiczne badanej substancji, które mogą zmienić jej właściwości toksykologiczne; wpływy na spożywanie pokarmu lub wody i wpływ na stan fizjologiczny zwierzęcia.

#### 1.4.4. Badanie dawki granicznej

Pełne badanie z użyciem substancji podawanej w różnych dawkach może być uważane za niepotrzebne w przypadku, gdy:

- badanie prowadzone drogą pokarmową przy zastosowaniu jednej dawki na poziomie przynajmniej 1000 mg/kg masy ciała/dzień albo podania w paszy lub w wodzie substancji w ilości stanowiącej odpowiedni ekwiwalent procentowy badanej substancji i przy zastosowaniu procedur opisanych w niniejszej metodzie nie powoduje powstania możliwych do zaobserwowania objawów działania toksycznego zarówno u zwierząt rodzicielskich, jak i u ich potomstwa,

- jeżeli nie należało się spodziewać takich skutków na podstawie istniejących danych (np. w przypadku związków strukturalnie i/lub metabolicznie podobnych).

Spodziewane narażenie ludzi może wskazywać na potrzebę zastosowania wyższej dawki podawanej drogą pokarmową niż w badaniu dawki granicznej. W przypadku innych sposobów podawania, takich jak inhalacyjne bądź skórne, właściwości fizykochemiczne badanej substancji, takie jak jej rozpuszczalność często mogą wskazywać na maksymalny możliwy do uzyskania poziom narażenia.

#### 1.4.5. Podawanie substancji

Badana substancja powinna być podawana zwierzętom 7 dni w tygodniu. Preferowane jest podawanie substancji drogą pokarmową (w paszy, w wodzie lub za pomocą sondy dożołądkowej). Jeżeli stosowany jest inny sposób podawania, to należy podać jego uzasadnienie; konieczne mogą być wtedy pewne modyfikacje. Badana substancja powinna być podawana wszystkim zwierzętom tą samą metodą podczas właściwego okresu doświadczenia. Jeżeli substancję podaje się dożołądkowo, to powinno stosować się sondę dożołądkową. Objętość podawanej cieczy jednorazowo nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała (0,4 ml/100 g masy ciała w przypadku oleju kukurydzianego), z wyjątkiem roztworów wodnych, gdy stosować można 2 ml/100 g masy ciała. Z wyjątkiem substancji drażniących lub żrących, które zwiększają skutki swego działania ze wzrostem stężenia, zmienność objętości powinna być minimalizowana przez dostosowanie stężenia tak, by zapewnić stałą objętość we wszystkich dawkach. W badaniach z zastosowaniem sondy młode będą otrzymywać badaną substancję pośrednio z mlekiem, dopóki nie rozpocznie się po odstawieniu podawanie substancji w typowy dla nich sposób. W badaniach z paszą lub wodą pitną młode będą dodatkowo otrzymywać badaną substancję bezpośrednio, gdy rozpoczną samodzielnie spożywać pokarm podczas ostatniego tygodnia okresu laktacji.

W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub w wodzie pitnej ważne jest upewnienie się, że dodane ilości badanej substancji nie zakłócają normalnej równowagi pokarmowej i wodnej. Jeżeli badana substancja podawana jest w pokarmie, to jej ilość może być wyrażona w postaci stałego stężenia w pokarmie (ppm) lub w postaci stałej dawki względem masy ciała zwierzęcia; każdy inny sposób wyrażenia dawki musi być opisany. W przypadku podawania sondą substancja podawana powinna być o ustalonych porach dnia i dostosowywana przynajmniej raz w tygodniu tak, aby utrzymać stały jej poziom względem masy ciała zwierzęcia. Pod uwagę powinno się brać informacje o przenikaniu przez barierę łożyska, dostosowując dawkę substancji podawanej sondą względem masy.

#### 1.4.6. Układy doświadczalne

Codziennie podawanie substancji w określonych dawkach samcom i samicom rodzicielskim (P) powinno rozpocząć się wtedy, gdy są one w wieku 5 do 9 ty-

godni. Codzienne podawanie substancji samcom i samicom pokolenia F1 powinno rozpocząć się przy odsadzeniu; należy pamiętać, że w przypadku podawania badanej substancji z paszą lub wodą pitną bezpośrednio narażenie młodych F1 na badaną substancję może wystąpić już w okresie laktacji. Dla obu płci (P i F1) podawanie substancji powinno być kontynuowane przez przynajmniej 10 tygodni przed okresem kojarzenia. Podawanie substancji powinno być kontynuowane u obu płci podczas 2 tygodni okresu kojarzenia. Samce należy w sposób humanitarny uśmiercić i przebadać, jeżeli nie są niezbędne do oceny skutków reprodukcyjnych. W przypadku samic rodzicielskich (P) podawanie substancji powinno być kontynuowane przez okres ciąży, aż do odsadzenia pokolenia F1. Pod uwagę powinno się brać modyfikacje schematu podawania substancji w zależności od dostępnych informacji dotyczących badanej substancji; należy uwzględnić istniejące dane o jej toksyczności, indukcji metabolicznej lub bioakumulacji. Dawka stosowana dla każdego zwierzęcia powinna być wyznaczona przy uwzględnieniu najnowszych pomiarów masy jego ciała. Należy być ostrożnym podczas dostosowywania dawki w ostatnim trymestrze ciąży.

Narażanie samców i samic P i F1 powinno trwać aż do zakończenia doświadczenia. Wszystkie dorosłe samce i samice P i F1 powinny zostać w sposób humanitarny uśmiercone, jeżeli nie są potrzebne do dalszych ocen skutków. Potomstwo F1 niewybrane do kojarzenia i potomstwo F2 powinno być w sposób humanitarny uśmiercone po odsadzeniu.

#### 1.4.7. Sposób kojarzenia

##### 1.4.7.1. Kojarzenie rodziców (P)

Dla każdego kojarzenia, każda samica powinna być umieszczona z jednym samcem z tej samej grupy narażanej (kojarzenie 1:1) aż do kopulacji lub do zakończenia dwutygodniowego okresu. Każdego dnia samice powinny być badane na obecność nasienia lub czopa pochwowego. Dzień zerowy ciąży określa się jako dzień odkrycia nasienia lub czopa pochwowego. W przypadku niepowodzenia kojarzenia pod uwagę można wziąć ponowne kojarzenie z samcami tej samej grupy. Kojarzone pary należy wyraźnie określić w danych. Należy unikać kojarzenia rodzeństwa.

##### 1.4.7.2. Kojarzenie pokolenia F1

Do kojarzenia potomstwa F1 przynajmniej jeden samiec i jedna samica powinny być wybrane przy odsadzeniu z każdego miotu do kojarzenia z innymi młodymi tej samej grupy narażanej, ale innego miotu, aby dać pokolenie F2. Wybór młodych z każdego miotu powinien mieć charakter losowy, jeżeli nie obserwuje się znaczących różnic w masie ciała lub wyglądzie w obrębie miotu. W przypadku zaobserwowania takich różnic wybrani powinni być najlepsi przedstawiciele z każdego miotu. Najlepiej opierać się w tym przypadku na zapisach masy ciała, ale właściwszym może być wybór w oparciu o wygląd. Potomstwo F1 nie powinno być kojarzone, aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości płciowej.

Pary, które nie mają potomstwa, powinny być zbadane w celu stwierdzenia przyczyny niepłodności. Konieczne mogą być takie procedury, jak dopuszczenie do ponownego kojarzenia z innymi samcami lub samicami, mikroskopowe badanie organów rozrodczych oraz badanie cyklu rujowego lub spermatogenezy.

##### 1.4.7.3. Drugie kojarzenie

W pewnych przypadkach, takich jak zmiany liczebności miotów spowodowane narażeniem na badaną substancję lub obserwacja podobnych skutków w pierwszym kojarzeniu zaleca się ponowne skojarzenie dorosłych P lub F1 w celu uzyskania drugiego miotu. Zaleca się ponowne kojarzenie samic lub samców, które nie wydały miotu ze sprawdzonymi osobnikami przeciwnej płci. Jeżeli wytworzenie drugiego miotu jest uznane za konieczne w którymkolwiek pokoleniu to zwierzęta powinny być ponownie kojarzone mniej więcej tydzień po odsadzeniu ostatniego miotu.

##### 1.4.7.4. Wielkość miotu

Zwierzętom należy pozwolić na normalne wydanie miotu i wychowywanie potomstwa, aż do jego odsadzenia. Standaryzacja rozmiarów miotu jest postępowaniem opcjonalnym. Jeżeli stosuje się standaryzację miotów, to zastosowana metoda powinna być szczegółowo opisana.

#### 1.5. Obserwacje

##### 1.5.1. Obserwacje kliniczne

Ogólne obserwacje kliniczne powinny być dokonywane codziennie, a w przypadku podawania sondą czas przeprowadzenia obserwacji powinien uwzględniać przewidywany szczytowy okres nasilenia skutków po narażeniu. Zmiany w zachowaniu, objawy trudnej lub przedłużonej ciąży i wszystkie objawy ciąży powinny być zapisane. Ponadto bardziej szczegółowe badanie każdego zwierzęcia powinno być przeprowadzone przynajmniej raz w tygodniu; najdogodniej uczynić to podczas jego ważenia. Dwa razy dziennie, a podczas weekendu raz dziennie wszystkie zwierzęta obserwuje się, poszukując zwierząt w stanie agonalnym oraz padłych.

##### 1.5.2. Masa ciała i spożycie paszy/wody osobników rodzicielskich

Samice rodzicielskie (P i F1) powinny być zważone pierwszego dnia narażenia, a następnie przynajmniej raz na tydzień. Samice rodzicielskie (P i F1) powinny być zważone przynajmniej w 0, 7, 14 i 20 lub 21 dniu ciąży, a podczas laktacji w tych samych dniach, w których odbywa się ważenie młodych, oraz w dniu uśmiercenia zwierząt. Obserwacje te powinny być zapisywane dla każdego dorosłego zwierzęcia oddzielnie. W okresie przed kojarzeniem i podczas ciąży mierzone powinno być spożycie paszy przynajmniej w odstępach tygodniowych. Jeżeli badana substancja podawana jest w wodzie, to spożycie wody powinno być mierzone przynajmniej w odstępach tygodniowych.

### 1.5.3. Cykl rujowy

Długość cyklu rujowego i jego normalność ocenia się u samic P i F1 przez rozmazy pochwowe wykonywane przed kojarzeniem i opcjonalnie podczas kojarzenia, dopóki nie nastąpi skojarzenie. Podczas pobierania komórek pochwowych/szyjki macicy należy być ostrożnym, by nie podrażnić błony śluzowej i w następstwie nie spowodować ciąży urojonej (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa).

### 1.5.4. Parametry nasienia

W czasie zakończenia doświadczenia u wszystkich samców P oraz F1 należy zapisać masę jąder i najądrzy. Do badań histopatologicznych należy zachować po jednym z tych organów (zobacz pkt 1.5.7 i pkt 1.5.8.1). Pozostałe jądra i najądrza uzyskane z przynajmniej 10 zwierząt z każdej grupy samców P i F1 powinny być użyte odpowiednio do policzenia spermatyd odpornych na homogenizację i zapasów nasienia z ogona najądrza. Od tych samych samców powinno pobrać się nasienie z ogona najądrza lub nasieniowodów w celu oszacowania jego ruchliwości i morfologii. Jeżeli obserwuje się skutki związane z narażaniem lub gdy istnieją dowody z innych badań takich wpływów na spermatogenezę, to ocena nasienia powinna zostać dokonana u wszystkich samców w każdej grupie narażanej; w pozostałych przypadkach liczenie może ograniczać się do grupy kontrolnej i grupy samców P i F1 otrzymujących substancję w najwyższej dawce.

Policzona powinna zostać całkowita liczba spermatyd jądrowych odpornych na homogenizację oraz liczba nasienia ogona najądrza (zobacz pozycje 2 i 3 piśmiennictwa). Zapasy nasienia ogona najądrza mogą być oszacowane na podstawie stężenia i objętości nasienia w zawieszynie stosowanej w oszacowaniach jakościowych, a także ilości nasienia odzyskanego w czasie homogenizacji pozostałej tkanki ogona najądrza. Liczenie powinno być wykonane na wybranej grupie samców ze wszystkich grup narażanych natychmiast po uśmierceniu zwierząt, chyba że dokonywane są zapisy video lub zapisy cyfrowe lub okazy są zamrażane, a analizy są wykonywane później. W tych przypadkach grupy kontrolne i grupy otrzymujące substancję w najwyższej dawce powinny być oceniane w pierwszej kolejności. Jeżeli nie obserwuje się żadnych skutków związanych z narażeniem (np. wpływ na liczbę nasienia, jego ruchliwość i morfologię), to inne grupy narażane nie muszą być analizowane. Gdy takie skutki zostaną jednak zauważone w grupie otrzymującej substancję w najwyższej dawce, to wtedy zwierzęta otrzymujące substancję w niższych dawkach także muszą być przeanalizowane.

Ruchliwość nasienia najądrza (lub nasieniowodu) powinno się oszacować lub filmować natychmiast po uśmierceniu zwierząt. Nasienie pobiera się, minimalizując uszkodzenia i rozcieńczając do analizy ruchliwości przy zastosowaniu uznanych metod (zobacz pozycja 4 piśmiennictwa). Wielkość procentowa ruchliwego nasienia powinna zostać określona subiektywnie lub obiektywnie. Jeżeli stosowana jest komputerowa

analiza ruchliwości (zobacz pozycje 5, 6, 7, 8, 9 i 10 piśmiennictwa), to wyliczenie ruchliwości zależy od progów średniej prędkości wyznaczonych przez operatora oraz prostoliniowości lub indeksu liniowości. Jeżeli próbki są filmowane (zobacz pozycja 11 piśmiennictwa), lub obrazy zapisywane są w inny sposób w czasie sekcji to ocenia się jedynie grupę kontrolną i grupę samców P i F1 otrzymujących substancje w najwyższej dawce, jeżeli nie obserwuje się skutków związanych z narażaniem; jeżeli takie skutki istnieją, to zwierzęta otrzymujące substancje w niższych dawkach także muszą być analizowane. W przypadku braku filmowania lub zapisu cyfrowego podczas sekcji powinny być analizowane wszystkie próbki wszystkich grup.

Należy wykonać morfologiczną analizę próbki nasienia najądrza (lub nasieniowodu). Nasienie (przynajmniej 200 na próbkę) powinno się badać w postaci utrzalonych mokrych preparatów (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa) i klasyfikować jako normalne lub nie-normalne. Przykładem morfologicznych nieprawidłowości nasienia jest fuzja, oddzielone główki, niekształcone główki i/lub ogony. Szacowanie powinno być dokonane na wybranej podgrupie samców wszystkich grup narażanych natychmiast po uśmierceniu zwierząt lub z wykorzystaniem zapisu cyfrowego lub filmowego w późniejszym czasie. Rozmazy po utrzaleniu także mogą być analizowane w późniejszym terminie. W tych przypadkach w pierwszej kolejności analizuje się grupę kontrolną i grupę zwierząt otrzymujących substancje w najwyższej dawce. Jeżeli nie obserwuje się skutków związanych z narażaniem (np. zmiany w morfologii), to zwierzęta z grup otrzymujących substancje w innych dawkach nie muszą być analizowane. Gdy takie skutki jednak występują to analizuje się wszystkie zwierzęta otrzymujące substancje we wszystkich dawkach.

Jeżeli jakkolwiek z powyższych parametrów nasienia był analizowany jako część badań toksyczności przynajmniej w badaniach 90-dniowych, to niekoniecznie musi być on ponownie powtarzany w badaniu dwupokoleniowym. Zaleca się jednak zachowanie próbek lub zapisów cyfrowych nasienia pokoleń P w przypadku konieczności późniejszej analizy.

### 1.5.5. Potomstwo

Każdy miot powinno się zbadać jak najszybciej po porodzie (dzień 0 laktacji) w celu ustalenia liczby i płci młodych, martwych i żywych oraz występowania nieprawidłowości. Młode martwe w dniu zerowym, jeżeli nie uległy maceracji, powinny zostać przebadane pod kątem możliwych wad i przyczyn śmierci oraz powinny być zachowane (utrwalone). Żywe młode powinno się policzyć i zważyć pojedynczo tuż po urodzeniu (dzień zerowy laktacji) lub w dniu 1 i w następnych dniach, np. w dniu 4, 7, 14 i 21 laktacji. Nieprawidłowości fizyczne lub behawioralne zaobserwowane u samic lub potomstwa powinny być zanotowane.

Fizyczny rozwój potomstwa powinien być zapisywany głównie na podstawie przyrostu masy ciała. Inne parametry fizyczne (np. rozwarcie szpary powiekowej i zewnętrznego przewodu słuchowego, wyróżnienie się

zębów, wzrost włosów) mogą dostarczyć dodatkowych informacji, ale dane te powinny być szacowane w kontekście dojrzewania płciowego (np.: wiek i masa ciała przy rozwarciu zewnętrznego ujścia pochwy i rozwoju gruczołu napletkowego) (zobacz pozycja 13 piśmiennictwa). Badania czynnościowe (aktywność motoryczna, czynność sensoryczna, odruchy) pokolenia F1 przed i po odsadzeniu, w szczególności te związane z dojrzewaniem płciowym, są zalecane, jeżeli nie są częścią osobnych badań. Przy rozwarciu zewnętrznego ujścia pochwy i rozwoju gruczołu napletkowego powinny być określone dla odsadzonych młodych F1 wybranych do kojarzenia. Odległość anogenitalna powinna zostać zmierzona w dniu zerowym po urodzeniu u młodych F2, jeżeli spowodowane są przez zmiany w stosunku płci F1 lub zmiany czasu dojrzewania płciowego.

Obserwacje czynnościowe mogą być pominięte w grupach, które przejawiają wyraźne objawy szkodliwych skutków (np.: znaczący spadek przyrostu masy). Jeżeli badania czynnościowe są wykonywane, to nie powinny być one robione na młodych wybranych do kojarzenia.

#### 1.5.6. Ogólne badania sekcyjne

Wszystkie zwierzęta rodzicielskie (P i F1) po zakończeniu badania i zwierzęta padłe podczas badania lub wszystkie młode, u których stwierdzono zewnętrzne nieprawidłowości lub nietypowe objawy kliniczne, a także przynajmniej jedno losowo wybrane młode/płeć/miot zarówno z pokolenia F1, jak i F2 powinno badać się makroskopowo na występowanie wad rozwojowych lub zmian patologicznych. Szczególną uwagę należy zwracać na narządy układu rozrodczego. Młode uśmiercone w sposób humanitarny lub będące w agonii i młode martwe, jeżeli nie podległy maceracji, powinny być przebadane pod względem możliwych wad i/lub przyczyn śmierci oraz powinny być zachowane (utrwalone).

Macice wszystkich samic pierworódek powinny być zbadane w sposób, który nie wyklucza badań histopatologicznych, pod względem obecności i liczby miejsc zagnieżdżeń.

#### 1.5.7. Masa narządów

Po zakończeniu badania powinno się określić masę ciała wszystkich zwierząt oraz masę następujących narządów wszystkich zwierząt rodzicielskich P i F1 (narządy występujące parami powinny być ważone pojedynczo):

- macica, jajniki,
- jądra, najądrza (całe i ogon),
- prostata,
- pęcherzyki nasienne z gruczołami koagulującymi i ich płyny oraz prostatą (razem),
- mózg, wątroba, nerki, śledziona, przysadka, gruczoły tarczycowy i nadnercza oraz znane narządy krytyczne.

Końcowe masy ciała powinny być określone dla młodych pokolenia F1 i F2, które zostały wybrane do sekcji. Następujące narządy z jednego losowo wybranego młodego/płeć/miot (zobacz pkt 1.5.6) powinny być zważone: mózg, śledziona i grasica.

Wyniki sekcji i masy narządów powinny być oszacowane w kontekście obserwacji poczynionych w innych badaniach, jeżeli były one prowadzone.

#### 1.5.8. Badania histopatologiczne

##### 1.5.8.1. Zwierzęta rodzicielskie

Następujące narządy i tkanki zwierząt rodzicielskich (P i F1), bądź ich reprezentatywne próbki, powinny być utrwalone i przechowywane w odpowiednim medium do badań histopatologicznych:

- pochwa, macica z szyjką i jajniki (zachowane w odpowiednim utrwalaczu),
- jedno jądro (zachowane w utrwalaczu Bouina lub porównywalnym), jedno najądrze, pęcherzyki nasienne, prostata i gruczoł koagulujący,
- uprzednio określone narząd(y) krytyczne wszystkich zwierząt P i F1 wybranych do kojarzenia.

Pełne wyniki badań histopatologicznych zachowanych narządów i tkanek podanych powyżej powinny zostać wykonane u wszystkich zwierząt P i F1 otrzymujących substancję w najwyższej dawce i u zwierząt z grupy kontrolnej wybranych do kojarzenia. Badanie jajników zwierząt P jest badaniem opcjonalnym. Narządy wykazujące zmiany związane z narażeniem powinny być także zbadane u zwierząt otrzymujących substancję w niższych dawkach tak, aby wspomóc oszacowanie NOAEL. Ponadto narządy rozrodcze zwierząt otrzymujących niższe dawki, u których można podejrzewać zmniejszoną płodność, np. takich, u których nie dochodziło do kojarzenia lub nie dochodziło do zapłodnienia, lub nie dały zdrowego potomstwa bądź też u których zmieniona była cykliczność rujowa, liczba nasienia, jego ruchliwość lub morfologia, powinny być poddane badaniom histopatologicznym. Wszystkie zwierzęta, u których stwierdzono większe uszkodzenia, takie jak atrofia lub guzy, powinny być także zbadane.

Szczegółowe badania histopatologiczne jąder (np.: z zastosowaniem utrwalacza Bouina, techniki parafinowej i wykonaniem przekrojów poprzecznych o grubości 4—5 µm) powinny być przeprowadzone w celu określenia skutków związanych z narażeniem, takich jak wstrzymane spermatydy, brakujące komórki nabłonka lub ich rodzaje, wielojądrowe komórki ogromne lub odpadanie tkanki komórek spermatogenetycznych w światło przewodu (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa). Badanie nienaruszonego najądrza powinno składać się z badania jego głowy, trzonu i ogona, co może być osiągnięte w badaniu przekroju podłużnego. Najądrze powinno być przebadane pod względem infiltracji leukocytów, zmian występujących w typach komórek, rodzajów komórek niewłaściwych oraz fago-

cytozy nasienia. Barwienie PAS i hematoksyliną może być stosowane w badaniu narządów rozrodczych samców.

Jajnik po okresie laktacji powinien zawierać pierwotne i wzrastające pęcherzyki, a także duże ciała żółte laktacji. Badanie histopatologiczne powinno wykryć jakościowe niedobory populacji pęcherzyków pierwotnych. Ilościowe oszacowanie pęcherzyków pierwotnych powinno być przeprowadzone dla samic F1; liczba zwierząt, wybór przekrojów jajnika oraz rozmiar próbki powinny być statystycznie odpowiednie do zastosowanej procedury oszacowania. Dla porównania jajników narażonych i kontrolnych badanie powinno zawierać policzenie pęcherzyków pierwotnych, które mogą być liczone wspólnie z małymi pęcherzykami wzrastającymi (zobacz pozycje 15, 16, 17, 18 i 19 piśmiennictwa).

#### 1.5.8.2. *Młode odsadzone*

Nietypowo wyglądające tkanki i narządy krytyczne wszystkich młodych, u których wystąpiły nieprawidłowości zewnętrzne lub nietypowe objawy kliniczne, a także przynajmniej od jednego losowo wybranego młodego/płeć/miot z pokolenia F1 i F2, które nie zostało wybrane do kojarzenia, powinny być utrwalone i zachowane w odpowiednim medium do badań histopatologicznych. Pełna charakterystyka histopatologiczna zachowanej tkanki powinna być wykonana ze szczególnym naciskiem położonym na narządy układu rozrodczego.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Opracowanie wyników

Dane powinny być zapisywane indywidualnie i zestawiane w formie tabel. Należy wykazać dla każdej badanej grupy i każdego pokolenia liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych podczas badania lub uśmierconych z powodów humanitarnych, czas śmierci lub uśmiercenia, liczbę zwierząt płodnych, liczbę samic w ciąży, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis zaobserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, trwanie i nasilenie objawów, rodzaje zmian histopatologicznych i wszystkie inne znaczące dane.

Dane liczbowe powinny być oszacowane właściwą ogólnie uznaną metodą statystyczną; metody statystyczne powinny być wybrane jako część składowa układu doświadczalnego. Do analizowania danych stosowane mogą być modele statystyczne typu dawka-odpowiedź. Sprawozdanie powinno zawierać szczegółowe informacje o metodzie analizy i zastosowanym programie komputerowym, tak by niezależny recenzent/statystyk mógł odtworzyć przebieg analizy i ponownie ją oszacować.

### 2.2. Oszacowanie wyników

Wyniki badania działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu dwupokoleniowego powinny być ocenione pod względem zaobserwowanych skutków, w tym wyniki sekcji i dane mikroskopowe. Oszacować

należy powiązanie, lub jego brak, pomiędzy dawką badanej substancji i obecnością lub nieobecnością, występowaniem i nasileniem nieprawidłowości, w tym poważnych uszkodzeń zidentyfikowanych organów krytycznych, zmienioną płodność, nieprawidłowości kliniczne, zmienioną wydajność reprodukcyjną i liczbę miotów, zmiany masy ciała, wpływy na śmiertelność i inne skutki działania toksycznego. Podczas oszacowania wyników powinno wziąć się pod uwagę właściwości fizykochemiczne badanej substancji oraz, jeżeli dostępne, to także dane o toksykokinetyce.

Właściwie przeprowadzone badanie toksyczności reprodukcyjnej powinno umożliwić przeprowadzenie w zadowalający sposób oszacowania poziomu bezwzględnych skutków oraz umożliwić zrozumienie szkodliwych wpływów na rozmnażanie, ciążę, laktację, rozwój poporodowy, w tym wzrost i rozwój płciowy.

### 2.3. Interpretacja wyników

Badanie toksyczności w teście dwupokoleniowym ma dostarczyć informacji na temat wpływów powtarzanego narażenia na substancję podczas wszystkich faz cyklu reprodukcyjnego. W szczególności badanie to dostarcza informacji o parametrach reprodukcji, rozwoju, wzrostu i przeżywalności potomstwa. Wyniki badania powinny być interpretowane w połączeniu z wynikami badań podprzewlekłych, przedporodowych rozwojowych, toksykokinetycznych i innych dostępnych. Wyniki niniejszego badania mogą być stosowane w szacowaniu potrzeby dalszych badań substancji chemicznej. Ekstrapolacja uzyskanych wyników na człowieka jest wiarygodna tylko w ograniczonym stopniu. Najlepiej stosować je do dostarczania informacji o dopuszczalnym narażeniu człowieka i o poziomie bez widocznych skutków (zobacz pozycje 20, 21, 22 i 23 piśmiennictwa).

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- stan fizyczny i gdy to ma znaczenie również właściwości fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne,
- czystość.

Nośnik (jeżeli był stosowany):

- uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli był inny niż woda.

Badane zwierzęta:

- gatunek/szczep,
- liczba, płeć i wiek zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasza, materiał używany na gniazdo itp.,

— masy ciała poszczególnych zwierząt na początku doświadczenia.

#### Warunki badania:

- uzasadnienie wybranych dawek,
- szczegóły dotyczące formulacji badanej substancji/przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie,
- trwałość i jednorodność używanego preparatu,
- szczegóły dotyczące podawania badanej substancji,
- przeliczenie stężenia (ppm) badanej substancji z pokarmu/wody pitnej na dawkę rzeczywistą (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli istnieje taka konieczność,
- szczegóły dotyczące paszy i wody pitnej.

#### Wyniki:

- spożycie paszy i, jeżeli dostępne, to spożycie wody, wykorzystanie paszy (przyrost masy ciała na gram spożytej paszy) i spożycie materiału badanego dla zwierząt P i F1 z wyjątkiem okresu kojarzenia i przynajmniej ostatniej jednej trzeciej okresu laktacji,
- dane o absorpcji (jeżeli dostępne),
- dane dotyczące masy ciała zwierząt P i F1 wybranych do kojarzenia,
- masa ciała młodych i liczebność miotów,
- masa ciała przy uśmierceniu oraz względne i bezwzględne masy narządów zwierząt rodzicielskich,
- istota, nasilenie i czas trwania obserwacji klinicznych (odwracalne czy nie),
- czas padnięcia podczas badania lub czy zwierzęta przeżyły do zakończenia badania,
- reakcja toksyczna według płci i dawki, w tym indeksy kojarzenia, płodności, ciąży, porodu, żywotności i laktacji; sprawozdanie powinno wykazywać liczby zastosowane do obliczeń tych indeksów,
- skutki toksyczne lub inne na reprodukcję, potomstwo, wzrost po porodzie itp.,
- wyniki sekcji,
- szczegółowy opis wszystkich zmian histopatologicznych,
- liczba samic P i F1 o normalnym cyklu rujowym i długość cyklu,
- całkowita liczba nasienia ogona najądrza, procent nasienia ruchliwego, procent nasienia normalnego morfologicznie, procent nasienia w przypadku każdej zidentyfikowanej nieprawidłowości,
- czas kojarzenia, w tym liczba dni potrzebnych do skojarzenia,

- czas trwania ciąży,
- liczba zagnieżdżeń, ciałek żółtych i rozmiar miotu,
- liczba zwierząt żywo narodzonych i strat po zagnieżdzeniu,
- liczba młodych z widocznymi nieprawidłowościami, jeżeli określona liczba skartowaciących to należy podać,
- dane o rozwoju poporodowym młodych,
- dane o obserwacjach czynnościowych u młodych i dorosłych,
- statystyczna analiza wyników.

Omówienie wyników.

Wnioski, w tym wartości NOAEL dla skutków działania na potomstwo i na osobniki dorosłe.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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**: 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 Dimethanesulfonate 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 Parreault S.D. (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using 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 Epichlorohydrin Administration: Methodologic and Statistical Consideration. *Journal of Andrology* **10**:401–415.
- 11) Working P.K. and M. Hurtt (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* **8**: 330–337.
- 12) Linder R.E. et al. (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* **6**: 491–505.
- 13) Korenbrot C.C. et al. (1977). Preputial Separation as an external Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* **17**: 298–303.
- 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 in 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. (1991). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Datson and C.A. Kimmel (eds.) ILSI Press, Washington DC.
- 20) Thomas J.A. (1991). Toxic Responses of 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 in Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- 22) Palmer A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel C.A. and F.C. Fraser (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.

Załącznik nr 9

## B.42. UCZULANIE SKÓRY: PRÓBA NA MIEJSCOWYM WĘZLE CHŁONNYM

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 429 (2002).

#### 1.1. Wstęp

Próba na Miejscowym Węzle Chłonnym (PMWCh) została wystarczająco uwierzytelniona i zaakceptowana, tak aby przyjąć ją jako nową metodę badawczą (zobacz pozycje 1, 2 i 3 piśmiennictwa). Jest to druga metoda służąca ocenie potencjału działania uczulającego substancji chemicznych na skórę zwierząt. Inna metoda opiera się na badaniu na świnkach morskich, a dokładniej jest to test maksymalizacji (B.6) i test Buehlera (zobacz pozycja 4 piśmiennictwa).

PMWCh jest metodą alternatywną dla wykrywania substancji chemicznych działających uczulająco na skórę lub dla potwierdzenia, że substancje chemiczne nie posiadają znaczącego potencjału wywołującego uczulanie skóry. Nie oznacza to, że w każdym przypadku można stosować PMWCh zamiast badań przeprowadzanych na świnkach morskich, ale raczej, że próba ta ma równą wartość i może być stosowana jako alter-

natywna, gdy wyniki pozytywne i negatywne nie wymagają z reguły dalszego potwierdzenia.

PMWCh ma pewne zalety zarówno z punktu widzenia postępu naukowego, jak i dobrostanu zwierząt. W metodzie tej bada się fazę indukcji uczulania skóry i uzyskuje ilościowe dane przydatne w szacowaniu zależności dawka-odpowiedź. Szczegóły walidacji PMWCh i przegląd towarzyszących prac opublikowano w piśmiennictwie (zobacz pozycje 5, 6, 7 i 8 piśmiennictwa). Ponadto należy odnotować, że substancje działające łagodnie/umiarkowanie uczulająco, które są zalecane jako odpowiednie do kontroli pozytywnej w metodach badań na świnkach morskich, również są odpowiednie w PMWCh (zobacz pozycje 6, 8 i 9 piśmiennictwa).

PMWCh jest metodą *in vivo* i w konsekwencji nie eliminuje stosowania zwierząt w ocenie kontaktowej aktywności uczulającej. Potencjalnie może jednak zmniejszyć liczbę zwierząt potrzebnych do osiągnięcia tego celu. Ponadto PMWCh stwarza znacznie łagodniejsze warunki, w jakich zwierzęta są stosowane w kontaktowym badaniu uczulenia. PMWCh opiera się na immunologicznych zjawiskach stymulowanych



przez substancje chemiczne w fazie indukcyjnej uczulania. W przeciwieństwie do badań na świnkach morskich PMWCh nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skórnej. Ponadto PMWCh nie wymaga stosowania adjuwanta, tak jak w metodzie maksymalizacji na świnkach morskich. Dlatego PMWCh zmniejsza obciążenie zwierząt. Pomimo zalet PMWCh w porównaniu do tradycyjnej metody na świnkach morskich, istnieją jednak pewne ograniczenia zmuszające do zastosowania tradycyjnej metody z świnkami morskimi (np. fałszywie negatywne wyniki dla niektórych metali w PMWCh, fałszywie pozytywne wyniki z niektórymi substancjami drażniącymi skórę) (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

Zobacz także Wprowadzenie część B.

## 1.2. Zasada metody badawczej

Zasadą leżącą u podstaw PMWCh jest to, że substancje uczulające pobudzają pierwotne namnażanie się limfocytów w węzle chłonny poddanemu miejscowemu działaniu substancji chemicznej. Namnażanie to jest proporcjonalne do podanej dawki (i do potencjału alergenu) i daje prosty sposób otrzymania obiektywnego, ilościowego pomiaru uczulenia. W PMWCh namnażanie to wycenia się jako zależność dawka-odpowiedź, a namnażanie w grupach narażanych porównuje się z namnażaniem w grupie kontrolnej z nośnikiem. Oznaczany jest stosunek namnażania w grupach narażanych i grupie kontrolnej, który nazywany jest Wskaźnikiem Stymulacji (WS). Aby badana substancja mogła być oceniona jako potencjalnie uczulająca skórę, musi on wynosić przynajmniej trzy. W opisanej metodzie do pomiarów namnażania się komórek stosuje się substancje znaczone radioaktywnie. Można jednak stosować inne sposoby do szacowania namnażania się komórek, pod warunkiem że jest to umotywowane i znajduje odpowiednie poparcie naukowe, zawierające pełne cytowania i opis metodologii.

## 1.3. Opis metody badawczej

### 1.3.1. Przygotowania

#### 1.3.1.1. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50–60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody.

#### 1.3.1.2. Przygotowanie zwierząt

Zwierzęta należy dobierać losowo, znakować dla umożliwienia indywidualnej identyfikacji (lecz nie za pomocą jakiegokolwiek znakowania uszu), przetrzymać w klatkach przynajmniej 5 dni przed rozpoczę-

ciem podawania substancji w celu aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem doświadczenia należy sprawdzić wszystkie zwierzęta, dla upewnienia się, czy nie posiadają widocznych uszkodzeń skóry.

### 1.3.2. Warunki badania

#### 1.3.2.1. Zwierzęta doświadczalne

W tym badaniu gatunkiem z wyboru jest mysz. Należy użyć do badań samice myszy szczepu CBA/Ca lub CBA/J, które są dziewicze i nieciążarne. Przy rozpoczęciu badania zwierzęta powinny być w wieku 8–12 tygodni, a różnica w masie ciała zwierząt powinna być jak najmniejsza i nie przekraczać 20 % średniej masy. Można używać innych szczepów i samców, gdy są wystarczające dane dla wykazania, że nie istnieją istotne specyficzne różnice w odpowiedzi w PMWCh zależne od szczepu i/lub płci.

#### 1.3.2.2. Sprawdzenie wiarygodności

Do wykazania właściwego przeprowadzenia próby i kompetencji laboratorium do prawidłowego wykonania doświadczenia stosuje się kontrolę pozytywną. Kontrola pozytywna powinna dać w PMWCh pozytywną odpowiedź na poziomie narażenia, dla którego przewiduje się wzrost wskaźnika stymulacji (WS)  $>3$  w stosunku do kontroli negatywnej. Dawkę w kontroli pozytywnej należy dobrać tak, by indukcja była wyraźna, lecz nie nadmierna. Zalecanymi substancjami są aldehyd heksylocynamonowy (No CAS 101-86-1, No EINECS 202-983-3) i merkaptobenzotiazol (No CAS 149-30-4, No EINECS 205-736-8). W określonych warunkach, po odpowiednim uzasadnieniu, można użyć innych substancji kontrolnych spełniających powyższe kryteria. Kontrola pozytywna wymagana jest zazwyczaj w każdym doświadczeniu, lecz mogą być sytuacje, gdy laboratoria badawcze posiadają dane archiwalne dotyczące kontroli pozytywnej, wskazujące na stałość zadowalających reakcji przez okres sześciu miesięcy lub dłuższy. W takich sytuacjach rzadsze sprawdzanie za pomocą kontroli pozytywnej jest właściwe, lecz w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy. Chociaż pozytywną kontrolę substancji należy sprawdzać w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje stałą odpowiedź (np. aceton: oliwa z oliwek), to mogą wystąpić szczególne okoliczności określone w odrębnych przepisach, w których będzie również konieczne przebadanie w niestandardowym nośniku (odpowiednia formuła o znaczeniu klinicznym/chemicznym). W takich sytuacjach należy przebadać możliwą interakcję pozytywnej kontroli z niekonwencjonalnym nośnikiem.

#### 1.3.2.3. Liczba zwierząt, poziom dawkowania i wybór nośnika

Należy stosować minimum po cztery zwierzęta w grupach narażanych i co najmniej trzy stężenia badanej substancji, grupę kontroli negatywnej otrzymującej jedynie nośnik badanej substancji i grupę kontroli pozytywnej, o ile stosowne. W przypadkach, w których wycenia się dane indywidualnych zwierząt, nale-

ży stosować minimum pięć zwierząt w grupie. Zwierzęta z grup kontrolnych należy traktować w ten sam sposób jak z grup narażonych, z wyjątkiem podawania badanej substancji.

Dobór dawek i nośnika należy opierać o zalecenia z publikacji (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Dawki należy dobrać z serii stężeń 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Gdy są dostępne wyniki ostrej toksyczności skórnej i drażnienia skóry, należy je brać pod uwagę przy doborze tych trzech kolejnych stężeń tak, by przy narażeniu na najwyższe stężenie uniknąć toksyczności ogólnoustrojowej i nadmierne go miejscowego podrażnienia skóry (zobacz pozycje 2 i 11 piśmiennictwa).

Nośnik należy dobierać, uwzględniając maksymalne stężenia substancji stosowanej w badaniu i maksymalną rozpuszczalność, by można uzyskać roztwory/zawiesiny odpowiednie dla podawania badanej substancji. Zaleca się nośniki w następującej kolejności: aceton/oliwa z oliwek (4:1 v/v), dimetyloformamid, keton metyloetylowy, propylenoglikol i dimetylosulfotlenek (zobacz pozycje 2 i 10 piśmiennictwa), ale mogą być również stosowane inne nośniki, o ile dysponuje się o nich odpowiednią wiedzą naukową. W niektórych przypadkach konieczne może być używanie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika stosowanego jako materiał do formulacji handlowej badanej substancji lub rozpuszczalnika ważnego z klinicznego punktu widzenia. W szczególności należy zapewnić, aby materiały hydrofilne były podawane z zastosowaniem nośnika, który zwilża skórę i nie spływa natychmiast. Dlatego należy unikać stosowania jedynie wodnych nośników.

### 1.3.3. Sposób postępowania

#### 1.3.3.1. Plan doświadczenia

Plan doświadczenia jest następujący:

— Dzień 1:

Ustalanie i zapisywanie indywidualnej masy ciała dla każdego zwierzęcia. Nanoszenie 25  $\mu$ l odpowiedniego roztworu badanej substancji, samego nośnika lub kontroli pozytywnej (jeżeli są stosowane) na grzbietową stronę każdego ucha zwierzęcia.

— Dzień 2 i 3:

Powtórzyć procedurę nanoszenia jak w dniu 1.

— Dzień 4 i 5:

Brak narażenia.

— Dzień 6:

Zapisać masę ciała każdego zwierzęcia. Każdej myszy, której podawano substancję, i myszy z grupy kontrolnej wstrzyknąć do żyły ogonowej po 250  $\mu$ l roztworu buforu fosforanowego (PBS) zawierającego 20  $\mu$ Ci (7,4e+8 Bq)  $^3$ H-metylotymidyny. Alternatywnie wstrzyknąć 250 (l roztworu PBS zawierającego 2  $\mu$ Ci (7,4e+7 Bq)  $^{125}$ I-jododeoksy-

urydyny i  $10^{-5}$  M fluorodeoksyurydyny wszystkim myszom do żyły ogonowej.

Po pięciu godzinach zwierzęta należy uśmiercić. Zwierzętom narażonym na substancję należy z każdego ucha wyciąć przyuszne węzły chłonne i zanurzyć w PBS. Z każdej badanej grupy (badanie w sposób grupowy) alternatywnie należy wyciąć pary węzłów chłonnych od każdego zwierzęcia i zanurzyć w PBS osobno dla każdego zwierzęcia (sposób indywidualny). Szczegóły i wykresy identyfikacji węzłów i analizy można znaleźć w załączniku I do pozycji piśmiennictwa (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

#### 1.3.3.2. Przygotowanie zawiesiny komórek

Zawiesiny komórek węzła chłonnego otrzymane ze zwierząt, badanych zarówno grupowo lub jak i od pojedynczych zwierząt, przygotowuje się poprzez łagodne mechaniczne rozdrobnienie na nierdzewnej siatce stalowej o oczkach 200  $\mu$ m. Komórki węzła chłonnego przemywa się dwukrotnie PBS dodanym w nadmiarze i wytrąca 5 % kwasem trichlorooctowym (TCA) w temp. 4 °C przez 18 godzin (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa). Granulki należy ponownie zawiesić w 1 ml kwasu trichlorooctowego i przenieść do fiolki scyntylicyjnej zawierającej 10 ml płynu scyntylicyjnego dla zliczenia  $^3$ H, lub przenieść bezpośrednio do próbki pomiarów gamma dla zliczenia  $^{125}$ I.

#### 1.3.3.3. Oznaczanie namnażania się komórek (radioaktywność związana)

Związanie  $^3$ H-metylotymidyny mierzy się za pomocą licznika  $\beta$ -scyntylicyjnego jako liczbę rozpadów na minutę. Związanie  $^{125}$ I-jododeoksyurydyny mierzy się za pomocą licznika  $^{125}$ I scyntylicyjnego i wyraża się również w postaci liczby rozpadów na minutę. W zależności od stosowanego sposobu badania wiązania wyraża się w postaci liczby rozpadów na minutę/narażana grupa (sposób grupowy) lub rozpad na minutę/zwierzę (sposób indywidualny).

#### 1.3.3.4. Obserwacje

##### 1.3.3.4.1. Obserwacje kliniczne

Zwierzęta należy obserwować starannie raz w ciągu dnia pod kątem objawów klinicznych albo miejscowego drażnienia w miejscach podania lub toksyczności ogólnoustrojowej. Wszystkie obserwacje łącznie z zapisami dla pojedynczych zwierząt należy systematycznie zapisywać.

##### 1.3.3.4.2. Masa ciała

Jak podano w pkt 1.3.3.1, masy ciała pojedynczych zwierząt należy ustalać na początku doświadczenia i przed planowym uśmierceniem zwierząt.

#### 1.3.4. Obliczanie wyników

Wyniki należy wyrazić w formie Wskaźnika Stymulacji (WS). Gdy stosuje się sposób grupowy, WS otrzy-

muje się dzieląc, związaną radioaktywność dla każdej narażanej grupy przez przyłączoną radioaktywność grupy kontrolnej z nośnikiem; to daje średni WS. Gdy stosuje się sposób indywidualny, WS oblicza się, dzieląc średni rozpad na minutę/mysz w ramach każdej narażanej grupy i grupę pozytywnej kontroli przez średni rozpad na minutę/mysz dla grupy kontrolnej rozpuszczalnik/nośnik. Średni WS dla grup kontrolnych z nośnikiem wynosi wtedy 1.

Zastosowanie sposobu indywidualnego do wyliczenia WS umożliwia przeprowadzenie statystycznej analizy wyników. Przy wyborze odpowiedniej metody analizy statystycznej badacz musi być świadomy możliwych nierówności wariancji i innych związanych z tym problemów, co może wymagać przetworzenia danych lub zastosowania nieparametrycznej analizy statystycznej. Za pomocą odpowiedniego sposobu interpretacji należy ocenić wszystkie indywidualne dane narażanych i kontrolnych zwierząt i dopasować na tej podstawie stosowną krzywą zależności dawka-odpowiedź, biorąc pod uwagę przedziały ufności (zobacz pozycje 8, 12 i 13 piśmiennictwa). Jednak badacz musi uważać na możliwe skrajne reakcje indywidualnych zwierząt wewnątrz grup, co może wymagać stosowania alternatywnych miar reakcji (np. raczej mediany, a nie średniej) lub eliminowania skrajnych danych.

Proces podejmowania decyzji odnośnie pozytywnej reakcji obejmuje WS  $\geq 3$ , łącznie z rozważeniem reakcji dawka-odpowiedź, i, o ile stosowne, istotności statystycznej (zobacz pozycje 3, 6, 8, 12 i 14 piśmiennictwa).

Jeżeli zachodzi potrzeba objaśnienia otrzymanych wyników, należy zwrócić uwagę na różne właściwości badanej substancji, w tym strukturalne podobieństwo do znanych substancji uczulających skórę, czy zdolność powodowania silnego drażnienia skóry i rodzaj reakcji dawka-odpowiedź. Te i inne okoliczności dyskutowane są szczegółowo w innym miejscu (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa).

## 2. WYNIKI

Wyniki należy zestawić w formie tabel, wykazując średnie i pojedyncze wartości rozpadu na minutę i wskaźniki stymulacji dla każdej badanej grupy (w tym grupa kontrolna z nośnikiem).

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- dane identyfikacyjne (np. numer CAS (jeżeli jest dostępny); źródło pochodzenia; stopień czystości; znane zanieczyszczenia; numer serii),
- stan skupienia i właściwości fizykochemiczne (np. lotność, trwałość, rozpuszczalność),
- w przypadku mieszanin skład i zawartość składników.

Nośnik:

- dane identyfikacyjne (stopień czystości; stężenie, o ile dotyczy; stosowana objętość),
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta doświadczalne:

- szczep stosowanych myszy,
- stan mikrobiologiczny zwierząt, jeżeli jest znany,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasze itd.

Warunki przeprowadzania badania:

- szczegóły przygotowania badanej substancji i jej podawanie,
- uzasadnienie wyboru dawek (łącznie z wynikami testu poszukiwania zakresu dawek, jeżeli prowadzono); stosowane stężenia badanej substancji i nośnika i ogólna ilość podawanej substancji,
- szczegóły jakości paszy i wody (łącznie z typem paszy i źródłem dostawy, źródło wody).

Sprawdzenie wiarygodności:

- podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności, łącznie z informacjami o substancji, stężeniu i stosowanym nośniku,
- równoległe uzyskane i/lub archiwalne pozytywne i negatywne dane kontrolne dla badającego laboratorium.

Wyniki:

- indywidualne masy ciała zwierząt na początku narażenia i przy planowanym ich uśmiercaniu;
- tabela z podaniem wartości średniej/mediany (sposób grupowy) lub indywidualnych (sposób indywidualny) rozpadu na minutę, jak również zakres wartości dla obu sposobów i wskaźników stymulacji dla każdej badanej grupy (łącznie z kontrolą nośnika),
- analiza statystyczna, gdy była stosowana,
- czas wystąpienia i objawy toksyczne, włącznie z podrażnieniem skóry w miejscu nałożenia, gdy wystąpiło, dla każdego zwierzęcia.

Dyskusja wyników:

- krótki komentarz do wyników, do analizy zależności dawka-odpowiedź i analizy statystycznej, gdy były stosowane, z wnioskiem czy badana substancja może być uznana za uczulającą skórę.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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., Dearman, 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 (1998).
- 4) OECD (1992). Guideline 406 Skin Sensitisation.
- 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*. (in press) 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: employment 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) OECD (2002). Guideline 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- 12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W., Lees, D., Kimber, I. and Botham, P.A. (1993). Results with OECD recommended positive control sensitizers 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, D.A., Blaikie, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R. and Rycroft, R.T.G. (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, 42, 344—48.

Załącznik nr 10

#### B.43. BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI NA GRYZONIACH

##### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 424 (1997).

Badanie przeprowadzone zgodnie z niniejszą metodą badawczą ma na celu dostarczenie informacji koniecznych dla potwierdzenia lub dalszego scharakteryzowania potencjalnej neurotoksyczności substancji chemicznych u dorosłych zwierząt. Może ona być łączona z innymi metodami badawczymi przy powtarzanym podawaniu dawki bądź też może być wykonywana jako oddzielne badanie. W projektowaniu badań

opartych o niniejszą metodę badawczą zaleca się korzystanie z Dokumentu Przewodniego OECD dotyczącego strategii i metod badawczych neurotoksyczności (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Jest to szczególnie ważne, gdy dokonuje się modyfikacji obserwacji i procedur badawczych zalecanych przy rutynowym stosowaniu niniejszej metody. Dokument Przewodni został przygotowany dla ułatwienia wyboru innych procedur badawczych stosowanych w szczególnych okolicznościach.

Oszacowanie neurotoksyczności rozwojowej nie jest przedmiotem niniejszej metody.

## 1.1. Wstęp

W szacowaniu i ocenie toksycznego charakteru substancji chemicznych ważne jest, aby wziąć pod uwagę potencjalne wystąpienie skutków neurotoksycznych. Już metoda badawcza przy powtarzanym podawaniu dawki uwzględnia obserwacje pod kątem potencjalnej neurotoksyczności. Niniejsza metoda badawcza może być stosowana w planowaniu badania mającego na celu uzyskanie dalszych informacji, bądź ich potwierdzeniu, co do skutków neurotoksycznych obserwowanych w badaniach toksyczności przy powtarzanym narażeniu. Uwzględnienie jednak możliwej neurotoksyczności pewnych klas substancji chemicznych może sugerować, że jest ona bardziej właściwie oszacowana przez niniejszą metodę bez wcześniejszych ustaleń możliwej neurotoksyczności w badaniach przy powtarzanym dawkowaniu. Takie rozważania zawierają na przykład:

- obserwacje objawów neurologicznych lub zmian neuropatologicznych w badaniach toksyczności innych niż te z powtarzanym dawkowaniem lub
- strukturalne pokrewieństwo lub inne informacje łączące je ze znanymi substancjami o działaniu neurotoksycznym.

Ponadto mogą wystąpić inne przypadki, gdy zastosowanie niniejszej metody badawczej jest właściwe; dalsze szczegóły można znaleźć w piśmiennictwie (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa).

Niniejszą metodę opracowano w taki sposób, aby mogła być przystosowana do spełnienia szczególnych potrzeb, potwierdzić specyficzną neurotoksyczność histopatologiczną lub behawioralną substancji chemicznej, a także dostarczyć charakterystykę i ocenę ilościową reakcji neurotoksycznych.

W przeszłości neurotoksyczność przyrównywano do neuropatii obejmującej zmiany neuropatologiczne lub zaburzenia neurologiczne, takie jak napad padaczkowy, paraliż lub drżenie. Chociaż neuropatia jest ważnym objawem neurotoksyczności to obecnie oczywistym jest, że istnieje wiele innych objawów toksyczności w układzie nerwowym (np.: utrata koordynacji motorycznej, osłabienie czucia, zaburzenia w uczeniu i zapamiętywaniu), które nie mają odbicia w neuropatii lub innych rodzajach badań.

Niniejsza metoda badawcza dotycząca neurotoksyczności przeznaczona jest do wykrywania głównych skutków neurobehawioralnych i neuropatologicznych u dorosłych gryzoni. Podczas gdy skutki behawioralne, nawet pod nieobecność zmian morfologicznych, mogą odzwierciedlać szkodliwy wpływ na organizm, to nie wszystkie zmiany behawioralne są specyficzne dla układu nerwowego. Dlatego każda obserwowana zmiana powinna być oszacowana w połączeniu z danymi histopatologicznymi, hematologicznymi lub biochemicznymi, jak również wynikami innego rodzaju badań toksyczności układowej. Do badań ujętych w niniejszej metodzie mających na celu dostarczenie charakterystyki i oceny ilościowej reakcji neurotok-

sycznych zalicza się procedury histopatologiczne i behawioralne, które mogą być dalej uzupełnione przez badania elektrofizjologiczne i/lub biochemiczne (zobacz pozycje 1, 2, 3 i 4 piśmiennictwa).

Substancje neurotoksyczne mogą działać na wiele miejsc w obrębie układu nerwowego za pomocą wielu mechanizmów. Żaden pojedynczy zestaw testów nie jest w stanie w pełni oszacować potencjału neurotoksycznego wszystkich substancji chemicznych, dlatego konieczne może być zastosowanie innych badań *in vivo* lub *in vitro* specyficznych dla rodzaju obserwowanej lub przewidywanej neurotoksyczności.

Niniejsza metoda badawcza może być także stosowana w połączeniu z wytycznymi zawartymi w Dokumentie Przewodnim OECD na temat strategii i metod badawczych neurotoksyczności (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa), do planowania badań zamierzających dalej charakteryzować lub zwiększać czułość oceny ilościowej typu dawka-odpowiedź lub lepiej oszacować poziom bez obserwowanego szkodliwego działania lub uzasadnić znane lub spodziewane zagrożenia powodowane przez substancję. Na przykład można zaplanować badanie mające na celu identyfikację i oszacowanie mechanizmów neurotoksycznych lub uzupełnić dane już istniejące z podstawowych obserwacji neurobehawioralnych i neuropatologicznych. Takie badania nie muszą powtarzać danych, które byłyby wygenerowane z zastosowania standardowych procedur niniejszej metody, jeżeli takie dane już istnieją i nie są uważane za niezbędne do interpretacji wyników badania.

Badanie neurotoksyczności, wykonywane osobno lub w połączeniu, dostarcza informacji, które mogą:

- stwierdzać, czy badana substancja działa na układ nerwowy w sposób odwracalny lub nieodwracalny,
- przyczynić się do charakterystyki zmian w układzie nerwowym towarzyszącym narażeniu na badaną substancję i do zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw tych zmian,
- określić zależności między wielkością dawki a czasem wystąpienia odpowiedzi (reakcji) celem oszacowania poziomu bez obserwowanego działania szkodliwego (stosowanego do określenia kryteriów bezpieczeństwa substancji chemicznej).

Niniejsza metoda badawcza opiera się na podawaniu badanej substancji drogą pokarmową. Inne drogi podawania (np.: przez skórę lub drogą inhalacyjną) mogą być bardziej właściwe, ale mogą wtedy wymagać modyfikacji zalecanych procedur. Wybór drogi podawania zależy od sposobu narażenia człowieka i dostępnych informacji toksykologicznych lub kinetycznych.

## 1.2. Definicje

**Szkodliwy skutek:** jest każdą zmianą w stosunku do wyjściowej zależną od narażenia, która zmniejsza zdolność organizmu do przeżycia, rozmnażania się lub przystosowania do środowiska.

**Dawka:** jest ilością podanej substancji. Dawkę wyraża się jako masę (np. mg) lub jako masę badanej substancji na jednostkę masy zwierzęcia doświadczalnego (np. mg/kg), lub jako stałe stężenie w paszy.

**Dawkowanie:** jest pojęciem ogólnym obejmującym dawkę, jej częstotliwość i czas trwania jej podawania.

**Neurotoksyczność:** jest szkodliwą zmianą w strukturze lub funkcjonowaniu układu nerwowego, która wynika z narażenia na czynnik biologiczny, chemiczny lub fizyczny.

**Czynnik neurotoksyczny:** to każdy czynnik biologiczny, chemiczny lub fizyczny posiadający możliwość spowodowania neurotoksyczności.

**NOAEL:** skrót dla poziomu dawkowania bez obserwowanego szkodliwego skutku, jest to najwyższy poziom dawki, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków związanych z narażeniem.

### 1.3. Zasada metody badawczej

Badana substancja podawana jest drogą pokarmową w szeregu dawek kilku grupom gryzoni laboratoryjnych. Wymagane jest powtarzane podawanie dawek, a czas dawkowania powinien być 28-dniowy, podprzewlekły (90 dni) lub przewlekły (1 rok lub dłużej). Procedury przedstawione w niniejszej metodzie badawczej mogą być także wykorzystane do badania ostrej neurotoksyczności. Zwierzęta są badane celem wykrycia lub scharakteryzowania nieprawidłowości behawioralnych i/lub neurologicznych. Rozpiętość zmian behawioralnych, które mogą być spowodowane przez substancję neurotoksyczną, jest określana w każdym okresie obserwacji. Pod koniec badania część zwierząt każdej płci z każdej grupy poddaje się perfuzji *in situ* i wykonuje sekcję mózgu, rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych.

Gdy doświadczenie jest prowadzone jako samodzielne badanie służące stwierdzeniu neurotoksyczności lub charakterystyce skutków neurotoksycznych, to zwierzęta w każdej grupie nieużyte do perfuzji i badań histopatologicznych (zobacz tabela B.43.1) mogą być użyte do specyficznych badań neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych, które uzupełnią dane otrzymane w standardowych badaniach wymaganych przez niniejszą metodę (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Te dodatkowe procedury mogą być szczególnie użyteczne, gdy obserwacje empiryczne lub przewidywane skutki wskazują na specyficzny rodzaj lub cel neurotoksyczności substancji chemicznej. Pozostałe zwierzęta mogą być także stosowane alternatywnie do oszacowań, takich jak te podane w metodach badawczych przy powtarzonym dawkowaniu na gryzoniach.

Gdy postępowanie według niniejszej metody jest łączone z postępowaniem wymaganym przez te inne metody, to wtedy potrzebna jest wystarczająca liczba zwierząt, by zapewnić obserwacje w obydwu badaniach.

## 1.4. Opis metody badawczej

### 1.4.1. Wybór gatunku zwierząt

Zalecany gatunkiem gryzoni jest szczur, chociaż inne gatunki gryzoni również mogą być stosowane po odpowiednim uzasadnieniu. Stosować należy powszechnie używane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych zwierząt. Samice powinny być dziewicze i nieciążarne. Dawkowanie powinno rozpocząć się jak najszybciej po odstawieniu nie później niż w wieku 6 tygodni, a w żadnym przypadku w wieku ponad 9 tygodni. Jeżeli jednak niniejsze badanie jest łączone z innymi, to wymagania co do wieku zwierząt mogą ulec pewnym modyfikacjom. Na początku doświadczenia różnica masy ciała nie powinna przekraczać  $\pm 20\%$  średniej masy ciała każdej płci. Jeżeli doświadczenie krótkoterminowe z powtarzaniem dawkowaniem prowadzone jest jako wstęp do badania długoterminowego, to w obydwu doświadczeniach należy stosować takie same szczepy zwierząt.

### 1.4.2. Warunki przetrzymywania i karmienia zwierząt

Temperatura w pomieszczeniach doświadczalnych powinna wynosić  $22 \pm 3$  °C. Wilgotność względna powinna wynosić 50–60 %, przy dopuszczalnych odchyleniach między 30 % a 70 % (wyższa wartość jedynie podczas czyszczenia pomieszczeń). Należy stosować sztuczne oświetlenie: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Natężenie hałasu należy ograniczyć do minimum. Do karmienia zwierząt powinna być stosowana typowa pasza laboratoryjna, należy zapewnić nieograniczony dostęp do wody. Na wybór pokarmu może wpływać konieczność zapewnienia odpowiedniego zmieszania badanej substancji, gdy taki jest jej sposób podawania. Zwierzęta można przetrzymywać indywidualnie lub w małych grupach tej samej płci.

### 1.4.3. Przygotowanie zwierząt

Zdrowe, młode zwierzęta są w sposób losowy przypisywane do grup narażonych i kontrolnej. Klatki powinny być umiejscowione w taki sposób, aby zminimalizować ewentualne skutki wynikające z ich użytkowania. Zwierzęta są jednoznacznie znakowane i trzymane w klatkach przez przynajmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania celem aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych (zobacz pozycja 5 piśmiennictwa).

### 1.4.4. Sposób podawania i przygotowanie dawek

Niniejsza metoda badawcza przeznaczona jest do podawania badanej substancji drogą pokarmową. Podawanie drogą pokarmową może być wykonywane za pomocą sondy, w paszy, wodzie pitnej lub kapsułkach. Inne sposoby podawania (np. przez skórę lub drogą inhalacyjną) mogą być stosowane, ale mogą wymagać modyfikacji stosowanych procedur. Wybór drogi narażenia zależy od profilu narażenia ludzi i dostępnych informacji toksykologicznych i kinetycznych. Należy podać uzasadnienie wyboru drogi narażenia i wynikające stąd modyfikacje procedur metody badawczej.

Jeżeli to konieczne, to badana substancja może być rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednim nośniku. W pierwszej kolejności zaleca się stosowanie roztworów/zawiesin wodnych, a w dalszej kolejności roztworów/zawiesin olejowych (np. w oleju kukurydzianym) i w końcu roztworów/zawiesin w innych nośnikach. Charakterystyka toksykologiczna nośnika powinna być znana. Ponadto należy uwzględnić następujące właściwości nośnika: wpływy nośnika na absorpcję, rozmieszczenie, metabolizm i retencję badanej substancji, które mogą zmienić jej charakterystykę toksykologiczną, wpływy na konsumpcję paszy i spożycie wody lub stan odżywienia zwierząt.

## 1.5. Sposoby postępowania

### 1.5.1. Liczba i płeć zwierząt

Jeżeli badanie wykonywane jest jako oddzielne, to wtedy należy stosować przynajmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców) w każdej grupie narażonej i kontroli celem dokonania szczegółowych obserwacji klinicznych i czynnościowych. Przynajmniej pięć samic i pięć samców z tych dziesięciu samców i dziesięciu samic powinno być poddane perfuzji *in situ* i użytych do szczegółowych badań neurohistopatologicznych pod koniec doświadczenia. W przypadkach gdy tylko ograniczona liczba zwierząt w danej grupie dawkowej przejawia oznaki skutków neurotoksycznych, należy uwzględnić te zwierzęta wśród tych przeznaczonych do perfuzji. Jeżeli badanie jest wykonywane w połączeniu z innym przy powtarzonym dawkowaniu, to należy stosować odpowiednie liczby zwierząt tak, by spełnić wymagania obydwu metod. Minimalne liczby zwierząt na grupę w różnych kombinacjach badań podano w tabeli B.43.1. Jeżeli planuje się likwidację zwierząt w trakcie doświadczenia bądź też dodatkowe grupy celem obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego wystąpienia skutków toksycznych po narażeniu lub gdy planuje się dodatkowe obserwacje, to wtedy liczba zwierząt powinna być zwiększona tak, by zapewnić zwierzęta potrzebne do obserwacji i badań histopatologicznych.

### 1.5.2. Grupy narażane i kontrolne

Ogólnie stosować należy przynajmniej trzy grupy narażane i grupę kontrolną, ale jeżeli na podstawie innych danych nie przewiduje się skutków przy powtarzanym dawkowaniu dawki 100 mg/kg masy ciała/dzień, to można wykonać badanie przy zastosowaniu dawki granicznej. Jeżeli brak jest wiarygodnych danych, to można przeprowadzić badanie wstępne celem ustalenia zakresu dawek w badaniu właściwym. Zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane tak samo pod każdym względem jak zwierzęta narażane, z wyjątkiem podawania badanej substancji. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji stosuje się nośnik, to grupa kontrolna powinna otrzymywać nośnik w najwyższej zastosowanej objętości.

### 1.5.3. Sprawdzenie wiarygodności

Laboratorium wykonujące badanie powinno przedstawić dane wykazujące jego zdolność do wy-

konania badania i czułość stosowanych sposobów postępowania. Takie dane powinny dostarczać dowodów na zdolność do wykrywania i ilościowej oceny, o ile dotyczy, zmian w różnych parametrach zalecanych do obserwacji, takich jak objawy autonomiczne, reakcje na bodźce, siła uchwytu i aktywność ruchowa. Informacje o substancjach, które powodują różne rodzaje reakcji neurotoksycznych i mogą być stosowane jako kontrola pozytywna, można znaleźć w pozycjach od 2 do 9 piśmiennictwa. Dane archiwalne mogą być stosowane, jeżeli podstawowe aspekty sposobów postępowania pozostają takie same. Zalecana jest okresowa aktualizacja danych archiwalnych. Nowe dane wykazujące ciągłą czułość sposobów postępowania powinny być wygenerowane, gdy jakieś podstawowe elementy badania lub sposobu postępowania zostały zmienione przez laboratorium wykonujące.

### 1.5.4. Wybór dawek

Przy doborze poziomu dawek powinny być brane pod uwagę jakiegokolwiek wcześniejsze obserwacje toksykologiczne i kinetyczne dostępne dla badanego związku lub materiałów podobnych. Najwyższy poziom dawkowania należy dobrać w taki sposób, by wywołać skutki neurotoksyczne lub wyraźne toksyczne skutki ogólnoustrojowe. W dalszej kolejności malejąca sekwencja dawek powinna być dobrana w taki sposób, by wykazać zależność typu dawka-odpowiedź i poziom bez obserwowanego działania szkodliwego (NOAEL) w najniższej dawce. W zasadzie poziomy dawkowania należy dobrać w taki sposób, by pierwotne działanie toksyczne na układ nerwowy można byłoby odróżnić od wpływów związanych z toksycznością ogólnoustrojową. Stosowanie dwóch do trzech przedziałów jest optymalne, a często dodatkowa czwarta grupa jest lepsza niż stosowanie bardzo dużych przedziałów (np. większych niż 10) pomiędzy dawkami. Tam gdzie istnieje wiarygodna ocena narażenia ludzi, to także ona powinna być brana pod uwagę.

### 1.5.5. Badanie przy zastosowaniu dawki granicznej

Jeżeli badanie w jednej dawce na poziomie przynajmniej 1000 mg/kg masy ciała/dzień, przy zastosowaniu procedury opisanej w niniejszej metodzie, nie daje rezultatu w postaci możliwych do zaobserwowania skutków neurotoksycznych i jeżeli nie należało się spodziewać skutków na podstawie istniejących danych co do strukturalnie podobnych związków, to wtedy pełne badanie z trzema poziomami dawek może być uważane za niepotrzebne. Spodziewane narażenie ludzi może wskazywać na potrzebę zastosowania wyższej dawki stosowanej doustnie w badaniu dawki granicznej. W przypadku innych sposobów podawania, takich jak inhalacyjne bądź skórne, własności fizykochemiczne badanej substancji, takie jak rozpuszczalność, często mogą wskazywać na maksymalny możliwy do uzyskania poziom narażenia. W badaniu ostrym doustnym dawka w badaniu dawki granicznej powinna wynosić przynajmniej 2000 mg/kg.



### 1.5.6. Podawanie dawek

Zwierzęta są narażane codziennie, siedem dni w tygodniu, przez przynajmniej 28 dni; zastosowanie 5-dniowego reżimu dawkowania lub krótszego czasu narażenia musi być uzasadnione. Gdy substancja podawana jest sondą, należy podawać pojedyncze dawki, stosując odpowiednią sondę żołądkową lub kaniulę intubacyjną. Maksymalna objętość cieczy, która może być podana jednorazowo, zależy od rozmiarów zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała. Jednakże w przypadku roztworów wodnych można brać pod uwagę użycie 2 ml/100 g masy ciała. Należy zminimalizować zmiany objętości, dostosowując stężenia tak, by zapewnić stałą objętość na wszystkich poziomach dawek poza substancjami drażniącymi i żrącymi, które w wyższych stężeniach mogą zwiększyć skutki działania.

W przypadku substancji podawanych z paszą lub wodą pitną ważne jest, by zapewnić, że wprowadzenie odpowiedniej ilości badanej substancji nie zakłóci normalnego żywienia lub bilansu wodnego zwierzęcia. Gdy badana substancja podawana jest w paszy, należy stosować stałe stężenie w paszy (ppm) lub stałe dawki w stosunku do masy ciała; należy opisać stosowany sposób. Jeżeli substancja podawana jest sondą, to powinno to następować o mniej więcej stałych porach każdego dnia i być dostosowywane na stałym poziomie względem masy ciała. Gdy badanie przy powtarzającym podawaniu pokarmowym jest stosowane jako wstęp do badania długoterminowego, to w obydwu badaniach stosować należy taką samą paszę. W badaniach ostrych, jeżeli zastosowanie pojedynczej dawki jest niemożliwe, to należy podawać substancję w mniejszych częściach przez okres czasu nieprzekraczający 24 godzin.

## 1.6. Obserwacje

### 1.6.1. Częstotliwość obserwacji i badań

W badaniach z powtarzającym dawkowaniem okres obserwacji powinien pokrywać okres dawkowania. W badaniach ostrych po narażeniu należy stosować 14-dniowy okres obserwacji. Dla zwierząt grup satelitarnych, które są przetrzymywane bez narażenia przez ustalony czas po zakończeniu dawkowania, obserwacje powinny pokrywać się z tym czasem.

Obserwacje należy czynić z odpowiednią częstotliwością celem maksymalizacji prawdopodobieństwa wykrycia jakichkolwiek nieprawidłowości behawioralnych i/lub neurologicznych. Obserwacje najlepiej prowadzić o tej samej porze każdego dnia, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych skutków po dawkowaniu. Częstotliwość obserwacji klinicznych i badań czynnościowych jest podana w tabeli B.43.2. Jeżeli dane kinetyczne i inne uzyskane w poprzednich badaniach wskazują na potrzebę zastosowania innych czasów obserwacji, badań lub okresów poobserwacyjnych, to należy przyjąć alternatywny schemat celem uzyskania maksimum możliwych obserwacji. Należy przedstawić uzasadnienie zmian schematu obserwacji.

### 1.6.1.1. Obserwacje ogólnego stanu zdrowia i śmiertelności/zachorowalności

**Wszystkie zwierzęta należy dokładnie obserwować pod względem stanu ich zdrowia przynajmniej raz dziennie, a także przynajmniej dwa razy dziennie pod względem śmiertelności i zachorowalności.**

### 1.6.1.2. Szczegółowe obserwacje kliniczne

Szczegółowe obserwacje kliniczne należy prowadzić dla wszystkich zwierząt wybranych do tego celu (zobacz tabela B.43.1) raz przed pierwszym narażeniem (by umożliwić dalsze porównania) i następnie w różnych odstępach w zależności od czasu trwania badania (zobacz tabela B.43.2). Szczegółowe obserwacje kliniczne w grupie satelitarnej należy prowadzić na koniec okresu rekonwalescencji. Szczegółowe obserwacje kliniczne należy prowadzić poza klatką w standardowych warunkach. Stosowane kryteria i skale punktowe powinny być wyraźnie określone przez laboratorium badawcze. Należy dążyć do tego, aby zmienność warunków doświadczalnych była minimalna (niezwiązana układowo z narażeniem) i by obserwacje były dokonywane przez wyszkolony personel nieznanący poziom narażenia zwierząt.

Zaleca się, aby obserwacje były prowadzone w sposób strukturalny o dobrze określonych kryteriach (wliczając definicję normalnego „zakresu”), które są systematycznie stosowane dla każdego zwierzęcia w każdym czasie obserwacji. „Normalny zakres” powinien być odpowiednio udokumentowany. Wszelkie zaobserwowane oznaki powinny być zapisane. Kiedy tylko jest to możliwe, notować także należy wielkość obserwowanych zmian. Obserwacje kliniczne powinny obejmować, ale nie ograniczać się do zmian na skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, występowaniu wydzielin i wydaliny oraz objawów autonomicznych (łzawienie, stroszenie sierści, rozmiar źrenicy, nietypowy sposób oddychania i/lub oddychania ustami, oznaki nietypowego oddawania moczu i wydalania kału, zmiany zabarwienia moczu).

Notować należy wszelkie nietypowe reakcje dotyczące pozycji ciała, poziomu aktywności (np. zwiększenie lub zmniejszenie penetracji standardowego obszaru) i koordynacji ruchów. Zapisywać należy zmiany w chodzie (np. chód kaczkowy, niezborność kończyn), postawie (np. zgrabiony grzbiet) i reakcji na traktowanie zwierząt lub inne bodźce otoczenia, a także pojawienie się ruchów tonicznych lub klonicznych, konwulsji lub drgawek, stereotypii (np. nadmierne czyszczenie się, niezwykle ruchy głowy, krążenie w kółko) lub dziwaczne zachowanie się (np. kąsanie lub nadmierne lizanie się, samookaleczanie, chodzenie tyłem, wydawanie dźwięków) lub agresja.

### 1.6.1.3. Badania czynnościowe

Podobnie do badań klinicznych badania czynnościowe należy przeprowadzić raz przed narażeniem i często w dalszej kolejności na wszystkich zwierzętach przeznaczonych do tego celu (zobacz tabela B.43.1). Częstotliwość badań czynnościowych jest także zależ-



na od czasu trwania badania (zobacz tabela B.43.2). W uzupełnieniu okresów obserwacji ustalonych w tabeli B.43.2 obserwacje czynnościowe grup satelitarnych powinny być wykonane możliwie blisko terminu likwidacji zwierząt. Do badań czynnościowych zalicza się reaktywność czuciową na bodźce różnej modalności, np.: bodźce słuchowe, wizualne i proprioceptywne (zobacz pozycje 5, 6 i 7 piśmiennictwa), oszacowanie siły uścisku (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa) i oszacowanie aktywności motorycznej (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa). Aktywność motoryczna powinna być mierzona urządzeniem automatycznym zdolnym do wykrywania wzrostu i spadku aktywności. Jeżeli stosowany jest inny zdefiniowany system, to powinien on dawać wyniki ilościowe, a jego czułość i wiarygodność powinny być wykazane. Każde urządzenie powinno być sprawdzone celem zapewnienia powtarzalności w czasie i zgodności pomiędzy urządzeniami. Dalsze szczegóły co do postępowania podano w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa. Jeżeli brak jest danych (np.: struktura-aktywność, dane epidemiologiczne, inne badania toksykologiczne) wykazujących możliwe skutki neurotoksyczne, to należy wziąć pod uwagę wykonanie bardziej specjalistycznych badań czynności sensorycznych i motorycznych lub uczenia się i zapamiętywania celem zbadania tych skutków bardziej szczegółowo. Więcej informacji na temat badań specjalistycznych i ich zastosowania podano w pozycji 1 piśmiennictwa.

W wyjątkowych sytuacjach zwierzęta wykazujące oznaki toksyczności w stopniu znacznie zakłócającym badania czynnościowe można wykluczyć z tych badań. Należy przedstawić uzasadnienie wykluczenia zwierząt z badań czynnościowych.

#### 1.6.2. Masa ciała i spożycie paszy/wody

W badaniach, które trwają do 90 dni, wszystkie zwierzęta powinny być ważone przynajmniej raz w tygodniu, a pomiary spożycia paszy (wody, gdy badana substancja podawana jest w tym nośniku) w odstępach przynajmniej tygodniowych. W przypadku badań długoterminowych wszystkie zwierzęta powinny być ważone przez pierwszy 13 tygodni raz w tygodniu i następnie przynajmniej co 4 tygodnie. Pomiary spożycia paszy (wody, gdy badana substancja podawana jest w tym nośniku) powinny być dokonywane przez pierwszych 13 tygodni raz w tygodniu i następnie w około 3-miesięcznych odstępach, chyba że stan zdrowia lub zmiany masy ciała sugerują inny sposób postępowania.

#### 1.6.3. Badania okulistyczne

W badaniach o czasie trwania dłuższym niż 28 dni badanie okulistyczne przy pomocy oftalmoskopu lub innego równorzędnego urządzenia powinno być wykonane przed podaniem badanej substancji i na koniec badania u wszystkich zwierząt lub, co najmniej u zwierząt otrzymujących najwyższą dawkę i zwierząt z grupy kontrolnej. Jeżeli wykryte zostaną zmiany w oczach lub jeżeli oznaki kliniczne wskazują na potrzebę badań, to wszystkie zwierzęta należy poddać takim badaniom. W przypadku badań długotermino-

wych badania należy także przeprowadzić po 13 tygodniach. Nie ma potrzeby prowadzenia badań okulistycznych, jeżeli takie wyniki są już dostępne z innych badań o podobnym czasie trwania i podobnych poziomach dawek.

#### 1.6.4. Hematologia i biochemia kliniczna

Gdy badanie neurotoksyczności jest wykonywane łącznie z ogólnoustrojowym badaniem toksyczności o powtarzanym dawkowaniu, to badania hematologiczne i biochemia kliniczna powinny być wykonane w odpowiednim czasie zgodnie z odpowiednią metodą badania toksyczności ogólnoustrojowej. Pobranie próbek powinno być wykonane w taki sposób, by zminimalizować jakiegokolwiek potencjalne skutki neurobehavioralne.

#### 1.6.5. Badania histopatologiczne

Badanie neuropatologiczne powinno uzupełniać i rozszerzać obserwacje poczynione podczas fazy *in vivo* badania. Tkanki z przynajmniej 5 zwierząt/płeć/grupę (zobacz tabela B.43.1 i następny akapit) powinny być utrwalone *in situ* przy zastosowaniu ogólnie uznanych metody perfuzji i utrwalania (zobacz pozycja 3 rozdział 5 piśmiennictwa i pozycja 4 rozdział 50 piśmiennictwa). Zapisywać należy wszelkie zmiany makroskopowe. Gdy badanie jest wykonywane jako samodzielne lub w celu wykrycia neurotoksyczności lub określenia skutków neurotoksycznych, pozostałe zwierzęta mogą być użyte do badań neurobehavioralnych (zobacz pozycje 10 i 11 piśmiennictwa), neuropatologicznych (zobacz pozycje 10, 11, 12 i 13 piśmiennictwa), neurochemicznych (zobacz pozycje 10, 11, 14 i 15 piśmiennictwa) lub elektrofizjologicznych (zobacz pozycje 10, 11, 16 i 17 piśmiennictwa) uzupełniających procedury niniejszej metody lub do zwiększenia liczby zwierząt do badań histopatologicznych. Te procedury uzupełniające mają szczególne znaczenie, gdy obserwacje empiryczne lub przewidywane skutki wskazują na specyficzny rodzaj lub sposób działania neurotoksycznego (zobacz pozycje 2 i 3 piśmiennictwa). Pozostałe zwierzęta można także odpowiednio użyć do badań patologicznych opisanych w metodach z zastosowaniem powtarzanego dawkowania.

Wszystkie próbki tkanek należy wybarwić ogólnie stosowanymi technikami barwienia z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny (H&E), zatopić w parafinie i zbadać techniką mikroskopową. Jeżeli obserwuje się lub podejrzewa oznaki ogólnej neuropatii obwodowej, to należy badać próbki tkanki nerwu obwodowego zatopione w tworzywie sztucznym. Objawy kliniczne mogą także sugerować badania dodatkowych miejsc bądź też zastosowanie specjalnych technik barwienia. Wskazówki dotyczące badania innych miejsc można znaleźć w pozycjach 3 i 4 piśmiennictwa. Pomocne mogą być odpowiednie barwienia celem wykazania specyficznych rodzajów zmian patologicznych (zobacz pozycja 18 piśmiennictwa).

Reprezentatywne skrawki centralnego i obwodowego układu nerwowego powinny być badane histologicznie (zobacz pozycja 3 rozdział 5 piśmiennictwa).

i pozycja 4 rozdział 50 piśmiennictwa). Badane powinno być: przodomózgowie, część centralna mózgu, w tym przekrój przez podwzgórze, śródmózdze, mózdzek, most, rdzeń przedłużony, oko z nerwem wzrokowym i siatkówką, rdzeń kręgowy z odcinka szyjnego i zgrubienia lędźwiowego, zwój górny nerwu błędnego, grzbietowe i brzuszne włókna nerwu błędnego, proksymalny nerw kulszowy, proksymalny nerw piszczelowy (przy kolanie), nerw piszczelowy mięśnia łydkowego. Sekcja rdzenia kręgowego i nerwu obwodowego powinna zawierać przekroje podłużne i poprzeczne. Szczególną uwagę należy zwrócić na ukształtowanie układu nerwowego. Zbadać należy także próbkę mięśnia szkieletowego, w szczególności łydkowego. Uwagę należy także zwrócić na miejsca o strukturze komórkowej i włóknistej w centralnym i obwodowym układzie nerwowym, o których wiadomo, że szczególnie podlegają wpływom przez substancje neurotoksyczne.

Wskazówki dotyczące zmian neuropatologicznych typowych po narażeniu na substancję toksyczną można znaleźć w pozycjach 3, 4 piśmiennictwa. Zaleca się etapowe badanie próbek tkanek, gdzie wycinki uzyskane od zwierząt z grupy otrzymującej substancję w najwyższej dawce są najpierw porównywane z tymi uzyskanymi od zwierząt z grupy kontrolnej. Jeżeli nie obserwuje się zmian neuropatologicznych w wycinkach z tych grup, to dalsza analiza nie jest konieczna. Jeżeli w wycinkach uzyskanych od zwierząt z grupy otrzymującej substancję w najwyższej dawce obserwuje się zmiany, to próbki tkanek uzyskanych od zwierząt, które mogły podlegać potencjalnym wpływom substancji podawanej w dawkach pośrednich i najniższej, muszą zostać zakodowane i kolejno przebadane.

Jeżeli w badaniach jakościowych zostaną stwierdzone zmiany neuropatologiczne, to należy przeprowadzić drugie badanie we wszystkich miejscach układu nerwowego wykazujących te zmiany. Skrawki uzyskane od zwierząt otrzymujących substancje w dawkach na wszystkich badanych poziomach z każdego potencjalnie zmienionego regionu należy zakodować i zbadać losowo bez znajomości kodu. Należy zapisać częstość każdej zmiany i jej nasilenie. Po zbadaniu wszystkich regionów ze wszystkich grup otrzymujących substancje w różnych dawkach kod należy złać i wykonać analizę statystyczną celem oszacowania zależności dawka-odpowiedź. Należy opisać przykłady różnych stopni nasilenia każdej zmiany.

Zmiany neuropatologiczne należy oceniać w kontekście obserwacji i pomiarów behawioralnych, a także innych danych z poprzednich i obecnego badania toksyczności substancji.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Opracowanie wyników

Należy przedstawić wyniki dla poszczególnych zwierząt. Ponadto wszystkie dane należy zestawić w postaci tabelarycznej, wykazując dla każdej grupy i grupy kontrolnej liczbę zwierząt na początku doświadczenia, liczbę zwierząt martwych w trakcie bada-

nia lub uśmierconych w humanitarny sposób oraz czas ich padnięcia lub uśmiercenia, liczbę zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, opis zaobserwowanych oznak toksyczności wraz z czasem ich pojawienia się, czasem trwania, rodzajem i nasileniem wszelkich skutków toksycznych, liczbą zwierząt wykazujących zmiany chorobowe wraz z ich rodzajem i nasileniem.

### 2.2. Oszacowanie i interpretacja wyników

Dane z badań należy wycenić pod względem występowania, nasilenia i korelacji skutków neurobehawioralnych i neuropatologicznych (neurochemicznych lub elektrofizjologicznych skutków także, jeżeli prowadzone były badania uzupełniające) oraz jakichkolwiek innych obserwowanych skutków. O ile to możliwe, to dane liczbowe powinny zostać poddane właściwej i ogólnie uznanej analizie statystycznej. Metody statystyczne należy dobrać na etapie projektowania doświadczenia.

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja, czystość),
- dane identyfikacyjne.

Nośnik (o ile był stosowany):

- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta doświadczalne:

- stosowany gatunek/szczep,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło pochodzenia, warunki przetrzymywania, pasza itd.,
- masy zwierząt (każde zwierzę oddzielnie) na początku doświadczenia.

Warunki przeprowadzania badania:

- szczegóły dotyczące formulacji badanej substancji/przygotowania paszy, uzyskane stężenie, trwałość i jednorodność używanego preparatu,
- podawane dawki, w tym dane dotyczące nośnika, jego objętości i stanu skupienia,
- szczegóły podawania badanej substancji,
- uzasadnienie wyboru dawek,
- uzasadnienie sposobu podawania i czasu trwania narażenia,
- przeliczenie stężenia badanej substancji w paszy/wodzie (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), gdy podawano w paszy/wodzie,
- szczegóły dotyczące jakości paszy i wody.

## Obserwacje i procedury badań:

- szczegóły dotyczące przypisania poszczególnych zwierząt w każdej grupie do podgrup przeznaczonych do perfuzji,
- szczegóły systemu punktacji wraz z kryteriami i skalą punktową dla każdego pomiaru w szczegółowych obserwacjach klinicznych,
- szczegóły badań czynnościowych oddziaływania czuciowego na bodźce o różnej modalności (np.: słuchowe, wzrokowe, proprioceptywne); szacowanie siły chwytności, szacowanie aktywności ruchowej (wraz ze szczegółami z badań wykrywania aktywności urządzeniami automatycznymi) oraz inne stosowane procedury,
- szczegóły badań okulistycznych i, o ile wykonywano, badań hematologicznych, biochemii klinicznej wraz z wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy kontrolnej,
- szczegóły dotyczące poszczególnych procedur neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych.

## Wyniki:

- masy ciała/zmiany masy ciała zwierząt także tych po uśmierceniu,
- spożycie paszy i wody, o ile dotyczy,
- dane dotyczące reakcji toksycznych według płci i poziomu dawkowania, w tym oznaki toksyczności lub śmiertelność,
- charakter, nasilenie i czas trwania (czas pojawienia się i przebieg) szczegółowych obserwacji klinicznych (odwracalne czy nie),
- szczegółowy opis wszystkich wykonanych badań czynnościowych,
- wyniki badania sekcyjnego,
- szczegóły wszelkich zmian neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych,
- dane o absorpcji i metabolizmie, o ile dostępne,
- analiza statystyczna, gdy stosowano.

## Dyskusja wyników:

- zależność dawka-odpowiedź,
- związek jakichkolwiek innych skutków toksycznych z wnioskiem o potencjale neurotoksycznym badanej substancji,
- poziom dawki bez obserwowanego działania szkodliwego.

## Wnioski:

- określenie ogólnej neurotoksyczności badanej substancji.

## 4. PIŚMIENNICTWO

- 1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
- 2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- 3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- 4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
- 5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, **40**, 999—1003.
- 6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, 343—352.
- 14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, **10**, 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, 368—378.
- 16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 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, pp. 726—742.
- 18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tabela B.43.1:

Minimalne liczby zwierząt w grupie, gdy badanie neurotoksyczności wykonuje się oddzielnie lub w kombinacji z innymi badaniami

	BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI PROWADZONE JAKO:			
	Oddzielne badania	Badanie łączone z testem 28-dniowym	Badanie łączone z testem 90-dniowym	Badanie łączone z testem przewlekłym
Całkowita liczba zwierząt w grupie	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	15 samców i 15 samic	25 samców i 25 samic
Liczba zwierząt przeznaczonych do badań czynnościowych wraz z obserwacjami klinicznymi	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic	10 samców i 10 samic
Liczba zwierząt przeznaczonych do perfuzji <i>in situ</i> i neurohistopatologii	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic	5 samców i 5 samic
Liczba zwierząt przeznaczonych do powtarzanego dawkowania/obserwacji toksyczności podprzewlekłej/przewlekłej, hematologii, biochemii klinicznej, histopatologii itp., jak wykazano w odpowiednich Wytycznych		5 samców i 5 samic	10 samców* i 10 samic*	20 samców* i 20 samic*
Obserwacje uzupełniające	5 samców i 5 samic			

\* W tym pięć zwierząt przeznaczonych do badań czynnościowych i szczegółowych obserwacji klinicznych jako część badania neurotoksyczności.

Tabela B.43.2:

## Częstotliwość obserwacji klinicznych i badań czynnościowych

Rodzaj obserwacji		Czas trwania badania			
		ostre	28-dniowe	90-dniowe	przewlekłe
u wszystkich zwierząt	ogólny stan zdrowotny	codziennie	codziennie	codziennie	codziennie
	śmiertelność/ zachorowalność	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie	dwa razy dziennie
U zwierząt przeznaczonych do obserwacji czynnościowych	Szczegółowe obserwacje kliniczne	- przed pierwszym narażeniem - w ciągu 8 godzin po podaniu w przewidywanym okresie szczytowym - w 7 i 14 dniu po podaniu	- przed pierwszym narażeniem - następnie co tydzień	- przed pierwszym narażeniem - raz w pierwszym lub drugim tygodniu narażenia - następnie co miesiąc	- przed pierwszym narażeniem - raz pod koniec pierwszego miesiąca narażenia - następnie co trzy miesiące
	Badania czynnościowe	- przed pierwszym narażeniem - w ciągu 8 godzin po podaniu w przewidywanym okresie szczytowym - w 7 i 14 dniu po podaniu	- przed pierwszym narażeniem - w ciągu 4 tygodni narażenia możliwie najbliżej okresu narażenia	- przed pierwszym narażeniem - raz w pierwszym lub drugim tygodniu narażenia - następnie co miesiąc	- przed pierwszym narażeniem - raz pod koniec pierwszego miesiąca narażenia - następnie co trzy miesiące

Załącznik nr 11

## C.21. MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIE PRZEMIAN AZOTU

## 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 216 (2000).

## 1.1. Wstęp

Niniejsza metoda opisuje laboratoryjną metodę badawczą służącą do oceny długoterminowego wpływu substancji chemicznych, po jednorazowym narażeniu, na aktywność mikroorganizmów glebowych w przemianach azotu. Badanie opiera się głównie na zaleceniach Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (zobacz pozycja 1 piśmiennic-

stwa). Uwzględnione zostały również inne wytyczne, takie jak niemieckie Biologicznego Urzędu Federalnego (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa), amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska US EPA (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa), SETAC (zobacz pozycja 4 piśmiennictwa) oraz Międzynarodowej Organizacji Standaryzacji ISO (zobacz pozycja 5 piśmiennictwa). Podczas posiedzenia OECD na temat wyboru gleby/osadu w Belgirate, Włochy w 1995 r. (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa), uzgodniono liczbę i rodzaj gleby, które można zastosować w badaniach wykonanych wg niniejszej metody. Zalecenia w zakresie pobierania, opracowania i przechowywania próbek glebowych, opierają się na Dokumencie Przewodnim ISO

(zobacz pozycja 7 piśmiennictwa) oraz na ustaleniach podjętych podczas spotkania roboczego w Belgirate. Podczas określania i szacowania charakterystyki toksykologicznej badanych substancji konieczne może okazać się oznaczenie ich wpływu na aktywność mikroorganizmów glebowych, np.: gdy wymagane są dane dotyczące potencjalnych skutków ubocznych środków ochrony roślin na mikroflorę glebową lub gdy spodziewane jest narażenie mikroorganizmów glebowych na substancje chemiczne inne niż środki ochrony roślin. Badanie przemian azotu wykonuje się w celu określenia wpływu takich substancji chemicznych na mikroflorę glebową. Podczas badania agrochemikaliów (środki ochrony roślin, nawozy, chemikalia stosowane w leśnictwie) wykonuje się zarówno badanie przemian azotu, jak i badanie przemian węgla. Przy badaniach innych substancji wystarczające jest badanie przemian azotu. Jeżeli jednak wartość  $EC_{50}$  w badaniu przemian azotu dla takich substancji znajduje się w tym samym zakresie jak dla handlowo dostępnych inhibitorów procesu nitrifikacji (np. nitrapyryna), to w celu zebrania dalszych informacji powinno być wykonane badanie przemian węgla.

Gleby składają się z żywych i nieożywionych składników, które istnieją w złożonych i heterogenicznych mieszaninach. Mikroorganizmy odgrywają ważną rolę w rozkładzie i przemianach materii organicznej w żyznych glebach, z wieloma gatunkami mającymi wkład w różne aspekty użyczenia gleby. Długoterminowe zakłócenie tych procesów biochemicznych może potencjalnie oddziaływać na krążenie składników odżywczych i poprzez to zmieniać żyzność gleby. Przemiany azotu i węgla następują we wszystkich żyznych glebach. Chociaż zespoły mikroorganizmów odpowiedzialne za te procesy różnią się między glebami, to szlaki przemian są zasadniczo takie same.

Badanie opisane w niniejszej metodzie ma służyć wykrywaniu długoterminowych szkodliwych wpływów substancji na proces przemiany azotu w aerobowych glebach powierzchniowych. Metoda badawcza pozwala także na oszacowanie wpływów substancji na przemiany węgla przez mikroflorę glebową. Powstawianie azotanów ma miejsce w następstwie rozpadu wiązań węgiel-azot. Dlatego też, jeżeli w glebach kontrolnych i badanych znajduje się równe ilości wytwarzanych azotanów, to wysoce prawdopodobny jest fakt, że główne szlaki przemian węgla są nienaruszone i funkcjonalne. Substrat wybrany do badania (sproszkowana lucerna) ma korzystny stosunek węgla do azotu (zazwyczaj pomiędzy 12:1 i 16:1). Z tego powodu zredukowany jest niedobór węgla w czasie badania i jeżeli zespoły mikroorganizmów są zniszczone przez substancję chemiczną, to mogą się one odrodzić w ciągu 100 dni.

Badanie, z którego wywodzi się niniejsza metoda badawcza, było pierwotnie zaprojektowane dla substancji, których ilość w glebie można było przewidzieć. Tak jest na przykład w przypadku środków ochrony roślin, dla których znana jest ich ilość stosowana w polu. W przypadku agrochemikaliów wystarczające jest badanie dwóch dawek, jakie przewiduje się lub przypuszcza, że będą stosowane. Agrochemikalia mogą

być badane jako substancje aktywne (s.a.) lub w postaci gotowych form użytkowych. Jednakże niniejsze badanie nie ogranicza się tylko do agrochemikaliów. Zmieniając zarówno ilość badanej substancji stosowanej do gleby, jak i sposób opracowania danych, badanie może być również wykonane w przypadku substancji chemicznych, w stosunku do których nie jest znana spodziewana ich ilość w glebie. Dlatego dla substancji innych niż agrochemikalia oznacza się wpływ serii stężeń na przemiany azotu. Dane z tych badań używane są do wyznaczenia krzywej zależności dawka-odpowiedź i wyliczenia wartości  $EC_x$ , gdzie  $x$  jest zdefiniowanym % skutku.

## 1.2. Definicje

**Przemiany azotu:** to rozkład przez mikroorganizmy materii organicznej zawierającej azot poprzez procesy amonifikacji i nitrifikacji do odpowiedniego nieorganicznego azotanowego produktu końcowego.

**$EC_x$  (Stężenie efektywne):** jest stężeniem badanej substancji w glebie powodującym  $x$  procent inhibicji przemian azotu do azotanów.

**$EC_{50}$  (Medialne stężenie efektywne):** jest stężeniem badanej substancji w glebie powodującym 50 % inhibicję przemian azotu do azotanów.

## 1.3. Substancje kontrolne

Brak.

## 1.4. Zasada metody badawczej

Do przesianej gleby dodaje się sproszkowany substrat roślinny, a próbkę poddaje się działaniu badanej substancji lub pozostawia bez dodatku badanej substancji (badanie kontrolne). Jeżeli badane są agrochemikalia, to zaleca się minimum dwa stężenia, które powinny być wybrane w odniesieniu do najwyższego stężenia, jakie przewiduje się w warunkach polowych. Po 0, 7, 14 i 28 dniach inkubacji próbki gleby badanej i kontrolnej są poddawane ekstrakcji z odpowiednim rozpuszczalnikiem i w ekstraktach oznacza się ilości azotanów. Ilość wytworzonych azotanów w próbkach badanych jest porównywana z wartością w próbkach kontrolnych. Następnie oblicza się procent odchylenia w stosunku do gleby kontrolnej. Wszystkie badania prowadzone są przez przynajmniej 28 dni. Jeżeli 28 dnia różnica między próbkami kontrolnymi i badanymi jest równa lub większa niż 25 %, to pomiary kontynuowane są maksymalnie 100 dni. Jeżeli badane są substancje inne niż agrochemikalia, to do próbek gleby dodaje się badaną substancję w stężeniach stanowiących serię, a ilości azotanów w próbce kontrolnej i próbkach badanych oznacza się po 28 dniach inkubacji. Wyniki badań z wieloma stężeniami analizowane są przy pomocy modelu regresji. Wyliczone są wartości  $EC_x$  (np.:  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  i/lub  $EC_{10}$ ).

## 1.5. Wiarygodność badania

Szacowanie wyników badania dla agrochemikaliów opiera się na stosunkowo małych różnicach (tj. średnia wartość (25 %) pomiędzy stężeniami azotanów w próbkach kontrolnych i próbkach badanych,

więc duże odchylenia w grupie kontrolnej mogą prowadzić do fałszywych wyników. Dlatego zmienność pomiędzy powtórzeniami w grupie kontroli powinna wynosić mniej niż  $\pm 15\%$ .

## 1.6. Opis metody badawczej

### 1.6.1. Wyposażenie

W badaniu stosuje się naczynia wykonane z obojętnego chemicznie materiału. Powinny być one odpowiedniej wielkości w zależności od zastosowanej procedury inkubacji gleb, tj. inkubacji całej partii gleby lub jako seria poszczególnych próbek glebowych (zobacz pkt 1.7.1.2). Należy poczynić starania, by zminimalizować straty wody z jednej strony, a z drugiej by umożliwić wymianę gazową podczas badania (np.: naczynia stosowane w badaniu mogą być przykryte perforowaną folią polietylenową). Gdy badane są substancje lotne, powinny być stosowane szczelne i nieprzepuszczalne dla gazu naczynia. Powinny one mieć takie rozmiary, aby próbka gleby wypełniała w przybliżeniu jedną czwartą ich objętości.

Stosowane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne:

- urządzenie wytrząsające: wytrząsarka mechaniczna lub inne odpowiednie,
- wirówka (3000 g) lub urządzenie do filtracji (z wykorzystaniem filtrów papierowych wolnych od azotanów),
- urządzenie o odpowiedniej czułości i powtarzalności do analizy azotanów.

### 1.6.2. Wybór i liczba gleb

Powinno stosować się glebę jednego rodzaju. Zaleca się stosować glebę o następującej charakterystyce:

- zawartość piasku: nie mniej niż 50 % i nie więcej niż 75 %,
- wartość pH: 5,5—7,5,
- zawartość węgla organicznego: 0,5—1,5 %,
- biomasa mikroorganizmów powinna być oznaczona (zobacz pozycje 8 i 9 piśmiennictwa), a zawartość węgla powinna stanowić przynajmniej 1 % całkowitego węgla organicznego gleby.

Najczęściej gleba o takiej charakterystyce jest najbardziej niekorzystnym przypadkiem, ponieważ adsorpcja badanej substancji jest minimalna, a jej dostępność dla mikroflory maksymalna. Dlatego też badania z innymi glebami są w zasadzie niepotrzebne. Jednakże w pewnych okolicznościach, np. gdy przewidywane zastosowanie badanej substancji będzie miało miejsce na szczególnych glebach, takich jak kwaśne gleby leśne, lub w przypadku substancji chemicznych naładowanych elektrostatycznie, konieczne może się okazać zastosowanie dodatkowej gleby.

## 1.6.3. Pobieranie i przechowywanie próbek gleby

### 1.6.3.1. Pobieranie próbek gleby

Dostępne powinny być szczegółowe informacje dotyczące historii miejsca, z którego pobierana jest gleba do badań. Podać należy dokładne miejsce, rodzaj roślinności pokrywającej, daty zastosowania środków ochrony roślin, zastosowanie nawozów organicznych i nieorganicznych, dodatki materiałów biologicznych lub przypadkowe zanieczyszczenia. Miejsce, z którego pobiera się próby gleby do badań, powinno być tak dobrane, aby umożliwić długoterminowe jego użycie. Odpowiednie są pastwiska stale wypasane, pola uprawne z jednorocznymi uprawami zbóż (z wyjątkiem kukurydzy) lub gęsto zasiane zielone łąki. Miejsce wybrane do pobierania próbek nie powinno być poddawane zabiegom z użyciem środków ochrony roślin przez minimum jeden rok przed pobraniem próbek. Ponadto przez przynajmniej sześć miesięcy przed pobieraniem prób nie powinno stosować się żadnego nawozu organicznego. Zastosowanie nawozu mineralnego jest możliwe tylko w przypadku wymagania tego przez rośliny uprawne, a próbki gleby nie powinny być pobierane wcześniej niż trzy miesiące po zastosowaniu nawozu. Należy unikać wykorzystywania gleb, na których stosowano nawozy o znanych skutkach działania biobójczego (np. cyjanamid wapnia).

Należy unikać pobierania próbek podczas lub tuż po długich okresach suszy (dłuższe niż 30 dni) lub spływów wody. W przypadku gleb ornych próbki należy pobierać z głębokości 0 do 20 cm. W przypadku łąk (pastwisk) lub innych gleb, gdzie orka nie była przeprowadzana przez długie okresy (przynajmniej jeden sezon), maksymalna głębokość pobierania próbek może wynosić nieco więcej niż 20 cm (np. do 25 cm). Probki gleby powinny być transportowane w pojemnikach i temperaturze, które gwarantują, że pierwotne właściwości gleby nie zostaną znacząco zmienione.

### 1.6.3.2. Przechowywanie próbek gleby

Najbardziej właściwe jest stosowanie gleby świeżo pobranej z pola. Jeżeli jednak nie ma sposobu na uniknięcie przechowywania w laboratorium, to gleby mogą być przechowywane w ciemności w temperaturze  $4 \pm 2$  °C przez maksimum trzy miesiące. Podczas przechowywania gleby należy zapewnić warunki tlenowe. Jeżeli gleby pobiera się z miejsc, gdzie są one zamrożone przez przynajmniej trzy miesiące w roku, to można rozważyć ich przechowywanie przez sześć miesięcy w temperaturze od  $-18$  °C do  $-22$  °C. Biomasa mikroorganizmów w przechowywanych glebach oznacza się przed każdym doświadczeniem. Węgiel w biomacie powinien stanowić przynajmniej 1 % całkowitego węgla organicznego (zobacz pkt 1.6.2).

## 1.6.4. Obróbka i przygotowanie gleby przed badaniem

### 1.6.4.1. Inkubacja wstępna

Jeżeli gleba była przechowywana (zobacz pkt 1.6.3.2), zaleca się inkubację wstępną przez odpo-



wiedni okres wynoszący od 2 do 28 dni. Temperatura i wilgotność gleby podczas inkubacji wstępnej powinny być podobne do tych stosowanych w badaniu (zobacz pkt 1.6.4.2. i pkt 1.7.1.3).

#### 1.6.4.2. Parametry fizykochemiczne

Glebę oczyszcza się ręcznie z dużych zanieczyszczeń (np. kamieni, części roślin) i następnie przesiewa do cząstek o rozmiarach równych lub mniejszych niż 2 mm. Wilgotność gleby powinna być dostosowana za pomocą wody destylowanej lub dejonizowanej do wartości pomiędzy 40 i 60 % maksymalnej pojemności wodnej.

#### 1.6.4.3. Dodanie substratu organicznego

Do gleby należy dodać odpowiedni substrat organiczny, np. sproszkowaną lucernę (główny składnik: *Medicago sativa*), w którym stosunek C:N zawarty jest pomiędzy 12:1 a 16:1. Zaleca się stosować 5 g lucerny na kilogram gleby (sucha masa).

#### 1.6.5. Przygotowanie badanej substancji w celu dodania do gleby

Badaną substancję podaje się z nośnikiem. Nośnikiem może być woda (dla substancji rozpuszczalnych w wodzie) lub obojętna stała substancja, taka jak drobny piasek kwarcowy (rozmiar cząstek: 0,1—0,5 mm). Należy unikać stosowania płynnych nośników innych niż woda (np.: rozpuszczalniki organiczne, takie jak aceton, chloroform), ponieważ mogą one zniszczyć mikroflorę. Jeżeli jako nośnik stosuje się piasek, to może on zawierać badaną substancję rozpuszczoną lub zawieszoną w odpowiednim rozpuszczalniku. W takich przypadkach rozpuszczalnik powinien być usunięty przez odparowanie przed wymieszaniem z glebą. Dla równomiernego rozprowadzenia badanej substancji w glebie zaleca się stosowanie 10 g piasku na kilogram gleby (sucha masa). Do próbek kontrolnych dodaje się taką samą ilość wody i/lub piasku.

Badając substancje lotne należy, na tyle na ile to możliwe, unikać strat podczas ich wprowadzania, a także należy poczynić starania, by w sposób jednorodny rozprowadzić substancję w glebie (np. substancja powinna zostać podana do gleby w kilku miejscach).

#### 1.6.6. Stężenia substancji badanej

Jeżeli badane są agrochemikalia, to powinny być zastosowane przynajmniej dwa stężenia. Niższe stężenie powinno odpowiadać przynajmniej maksymalnej ilości substancji, jakiej można się spodziewać w glebie w warunkach praktycznych, natomiast wyższe stężenie powinno być wielokrotnością stężenia niższego. Stężenia badanej substancji dodanej do gleby oblicza się przy założeniu jednorodnego rozmieszczenia do głębokości 5 cm i gęstości gleby 1,5. W przypadku agrochemikaliów stosowanych bezpośrednio do gleby lub dla substancji chemicznych, których ilość w glebie można przewidzieć, zalecane stężenia badane to maksymalne Przewidywane Stężenie w Środowisku (PEC) i jego pięciokrotność. W przypadku substancji, które stosuje się

kilkakrotnie w czasie sezonu, badane stężenia wyznacza się, mnożąc PEC przez maksymalną przewidywaną liczbę stosowań. Jednakże najwyższe stosowane stężenie nie powinno przekraczać dziesięciokrotności maksymalnej jednorazowo zastosowanej dawki. Jeżeli badane są substancje inne niż agrochemikalia, należy stosować serię pięciu stężeń w postępie geometrycznym. Badane stężenia powinny obejmować zakres konieczny do wyznaczenia wartości  $EC_x$ .

### 1.7. Wykonanie badania

#### 1.7.1. Warunki narażenia

##### 1.7.1.1. Stężenia substancji badanej i kontrola

Jeżeli badane są agrochemikalia, badaną próbkę gleby dzieli się na trzy części o równej masie. Dwie części miesza się z nośnikiem zawierającym badany produkt, a trzecią część miesza się z nośnikiem bez badanego produktu (kontrola). Zaleca się stosowanie minimum trzech powtórzeń dla stężeń i kontroli. W przypadku badania substancji innych niż agrochemikalia glebę dzieli się na sześć części o równej masie. Pięć z nich miesza się z nośnikiem zawierającym badaną substancję, a szóstą miesza się z nośnikiem bez badanej substancji. Zarówno dla kontroli, jak i badanych serii stężeń zaleca się prowadzenie trzech powtórzeń. Należy podjąć wszelkie starania w celu zapewnienia jednorodnego rozprowadzenia badanej substancji w próbkach gleby. Podczas mieszania należy unikać ubijania i zgniatania gleby.

##### 1.7.1.2. Inkubacja próbek glebowych

Inkubacja próbek glebowych może być przeprowadzona na dwa sposoby: całej partii gleby z badaną substancją i gleby kontrolnej lub z wykorzystaniem różnych części poszczególnych próbek gleby kontrolnej i z badaną substancją. Jeżeli inkubuje się całą partię gleby, to należy przygotować dużą ilość próbek kontrolnych i z badaną substancją, żeby podczas badania pobierać z nich małe próbki do analizy. Wyjściowa masa przygotowanej gleby pierwotnej i w stężeniach zależy od rozmiaru próbek pobieranych do analizy, liczby zastosowanych powtórzeń w analizie oraz przewidywanej maksymalnej krotności pobierania. Gleby inkubowane w całości przed pobieraniem próbek do analizy powinny zostać dobrze wymieszane. Jeżeli gleby są inkubowane jako poszczególne próbki, to każda z nich, zarówno kontrolna, jak i z badaną substancją dzielona jest na wymaganą liczbę mniejszych próbek i te są wykorzystywane według potrzeby. W doświadczeniach, gdzie przewiduje się więcej niż dwa pobrania próbek do analizy, mniejsze próbki powinny być przygotowane w ilości wystarczającej dla wszystkich powtórzeń we wszystkich punktach czasowych pobierania próbek. Powinny być inkubowane przynajmniej trzy powtórzenia badanej gleby w warunkach tlenowych (zobacz pkt 1.7.1.1). Podczas wszystkich badań stosowane powinny być odpowiednie pojemniki o powierzchni pozwalającej na uniknięcie rozwoju warunków beztlenowych. Jeżeli badane są substancje lotne, badania należy prowadzić z serią poszczególnych próbek.

### 1.7.1.3. Warunki i czas trwania badania

Badanie jest wykonywane w ciemności w temperaturze pokojowej  $20 \pm 2$  °C. Wilgotność próbek gleby powinna być utrzymywana w czasie badania pomiędzy 40 % a 60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zobacz pkt 1.6.4.2) z odchyleniem  $\pm 5$  %. W miarę potrzeby można dodać wodę destylowaną lub dejonizowaną.

Minimalny czas trwania badania wynosi 28 dni. Jeżeli badane są agrochemikalia, to porównywane są ilości wytworzonych azotanów w próbkach kontrolnych i z badaną substancją. Jeżeli po 28 dniach różnią się one o więcej niż 25 %, to badanie jest kontynuowane aż osiągnie się różnicę równą lub mniejszą niż 25 % lub przez maksimum 100 dni w zależności od tego, co nastąpi wcześniej. Dla substancji innych niż agrochemikalia badanie kończy się po 28 dniach. Po 28 dniach w próbkach kontrolnych i próbkach gleby z badaną substancją oznacza się ilość azotanów i oblicza wartości  $EC_x$ .

### 1.7.2. Pobieranie próbek i analiza gleb

#### 1.7.2.1. Terminy pobierania próbek gleby

Jeżeli bada się agrochemikalia, to próbki gleby do analizy azotanów pobiera się w 0, 7, 14 i 28 dniu. Jeżeli konieczne jest przedłużenie badania, dalsze pomiary powinno wykonywać się w odstępach 14-dniowych.

Jeżeli bada się substancje inne niż agrochemikalia, to należy stosować przynajmniej pięć stężeń, a próbki gleby badać na zawartość azotanów na początku (dzień 0) i na koniec okresu narażenia (28 dzień). Dodatkowy pomiar, np. w 7 dniu, może być również wykonany, jeżeli zostanie to uznane za konieczne. Dane otrzymane w 28 dniu są używane do wyznaczenia wartości  $EC_x$  dla substancji chemicznej. Jeżeli jest to wymagane, to dane z próbek kontrolnych z dnia 0 mogą zostać wykorzystane do podania początkowej ilości azotanów w glebie.

#### 1.7.2.2. Analiza próbek glebowych

Ilość wytworzonych azotanów w każdym powtórzeniu próbek z badaną substancją i glebie kontrolnej oznacza się za każdym razem podczas pobierania próbek. Azotany ekstrahuje się z gleby przez wytrząsanie z odpowiednim rozpuszczalnikiem, np. 0,1 M roztworem chlorku potasu. Zaleca się stosowanie 5 ml roztworu KCl na gram suchej masy gleby. W celu optymalizacji ekstrakcji naczynia zawierające glebę do ekstrakcji i roztwór ekstrakcyjny powinny być napełnione nie więcej niż do połowy. Mieszaniny wytrząsa się przez 60 minut, przy prędkości 150 obrotów na minutę. Mieszaniny odwirowywuje się lub filtruje. Fazy ciekle analizuje się na zawartość azotanów. Ekstrakty wolne od cząsteczek mogą być przechowywane przed analizą w temperaturze minus  $20 \pm 5$  °C do sześciu miesięcy.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Obliczanie wyników

Jeżeli badanie wykonuje się z agrochemikaliami, to ilość wytworzonych azotanów w każdej podwójnej próbce powinna być zapisana, a średnie wartości ze wszystkich powtórzeń powinny zostać zestawione w formie tabeli. Przemiany azotu powinny zostać oszacowane za pomocą odpowiedniej i ogólnie uznanej metody statystycznej (np. test F, poziom istotności 5 %). Ilości wytworzonego azotanu wyraża się w mg azotanu/kg suchej masy gleby/dzień. Ilość wytworzonego azotanu w każdym stężeniu porównuje się z ilością w glebie kontrolnej i obliczany jest procent odchylenia względem kontroli.

Jeżeli badanie wykonywane jest dla substancji innych niż agrochemikalia, to określa się ilość wytworzonych azotanów w każdym powtórzeniu i dla oszacowania wartości  $EC_x$  wyznacza się krzywą zależności dawka-odpowieź. Ilości azotanów (tj. mg azotanu/kg suchej masy gleby) oznaczonych w próbkach traktowanych po 28 dniach porównuje się z próbkami kontrolnymi. Z tych danych oblicza się procent inhibicji dla każdego stężenia. Wartości wyrażone w procentach należy korelować z odpowiednimi stężeniami. Procedury statystyczne powinny umożliwić obliczenie wartości  $EC_x$ . Przy zastosowaniu standardowych procedur (zobacz pozycje 10, 11 i 12 piśmiennictwa) dla obliczonych wartości  $EC_x$  wyznacza się także przedziały ufności ( $p=0,95$ ).

Badane substancje, które zawierają duże ilości azotu, mogą spowodować wzrost ilości azotanów wytwarzanych w czasie badania. Jeżeli takie substancje badane są w wysokich stężeniach (np. substancje stosowane wielokrotnie), to w badaniu musi zostać zastosowana właściwa kontrola (tj. gleba plus badana substancja, ale bez substratu roślinnego). Dane z takiej kontroli należy uwzględnić w obliczeniach wartości  $EC_x$ .

### 2.2. Interpretacja wyników

Jeżeli szacuje się wyniki z badania agrochemikalii, a różnica w ilości wytworzonych azotanów pomiędzy niższą dawką (tj. maksymalnym przewidywanym stężeniem w środowisku) a dawką stosowaną w badaniu kontrolnym jest równa lub niższa niż 25 % w jakimkolwiek czasie pobierania próbki po 28 dniu, to produkt może zostać scharakteryzowany jako niemający długoterminowego wpływu na przemiany azotu w glebie. Przy szacowaniu wyników z badań substancji innych niż agrochemikalia stosuje się wartości  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  i/lub  $EC_{10}$ .

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Dokładna identyfikacja stosowanej gleby:

— umiejscowienie geograficzne (długość, szerokość),

- informacje o historii miejsca (tj. rodzaj roślinności pokrywającej, zastosowane środki ochrony roślin, nawozy, przypadkowe zanieczyszczenia),
- zastosowanie gleby (gleba rolnicza, leśna, itp.),
- głębokość pobierania gleby (cm),
- zawartość piasku/iżu/gliny (% suchej masy),
- wartość pH (w wodzie),
- zawartość węgla organicznego (% suchej masy),
- zawartość azotu (% suchej masy),
- początkowe stężenie azotanów (mg azotanów/kg suchej masy),
- zdolność wymiany jonowej (mmol/kg),
- biomasa mikroorganizmów wyrażona w procentach całkowitej zawartości węgla organicznego,
- metody stosowane do oznaczenia każdego parametru,
- wszystkie informacje dotyczące pobierania i przechowywania próbek,
- szczegóły dotyczące wstępnej inkubacji gleby.

#### Badana substancja:

- postać fizyczna i istotne właściwości fizykochemiczne,
- nazwa chemiczna oraz wzór strukturalny, czystość (tj. dla środków ochrony roślin procentowa zawartość substancji aktywnej), zawartość azotu.

#### Substrat:

- źródło substratu,
- skład (tj. lucerna, lucerna — trawa),
- zawartość węgla i azotu (% suchej masy),
- rozmiar sita (mm).

#### Warunki badania:

- szczegóły dotyczące wzbogacenia gleby substratem organicznym,
- liczba stężeń badanej substancji i uzasadnienie wyboru stężeń,
- szczegóły dotyczące sposobu podania badanej substancji do gleby,
- temperatura inkubacji,
- wilgotność gleby na początku i podczas trwania badania,
- zastosowana metoda inkubacji gleby (cała partia gleby czy jako seria poszczególnych próbek gleby),

- liczba powtórzeń,
- informacja o tym, ile razy pobierano próbki,
- metoda stosowana do ekstrakcji azotanów z gleby.

#### Wyniki:

- procedura analityczna i sprzęt stosowany do analizy azotanów,
- dane zawierające poszczególne wyniki i wartości średnie pomiarów azotanów w postaci tabeli,
- odchylenia pomiędzy powtórzeniami w próbkach narażanych i kontrolnych,
- wyjaśnienia poprawek w obliczeniach, jeżeli konieczne,
- odchylenia w wytwarzaniu azotanów w każdym czasie pobierania próbek wyrażone w procentach lub w postaci wartości  $EC_{50}$  z 95 % przedziałami ufności, inne wartości  $EC_x$  (tj.  $EC_{25}$  lub  $EC_{10}$ ) z przedziałami ufności oraz wykres krzywej zależności dawka-odpowiedź,
- statystyczne opracowanie wyników,
- wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 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 (2<sup>nd</sup> 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) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality — Biological Methods. PN-ISO 14238:2000 Jakość gleby — Metody biologiczne — Oznaczanie mineralizacji azotu i nitrifikacji w glebach oraz wpływu związków chemicznych na te procesy.
- 6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18—20 January 1995.

- 7) ISO 10381—6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. PN-ISO 10381—6:1998 Jakość gleby — Pobieranie próbek — Zasady dotyczące pobierania, postępowania z próbkami i przechowywania próbek gleby przeznaczonych do badania tlenowych (aerobowych) procesów mikrobiologicznych w warunkach laboratoryjnych.
- 8) ISO 14240—1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate — induced respiration method. PN-ISO 14240—1:2001 Jakość gleby — Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda indukcji oddychania przez dodanie substratu.
- 9) ISO 14240—2 (1997). Soil quality — Determination of microbial biomass — Part 2: Fumigation — extraction method. PN-ISO 14240—2:2001 Jakość gleby — Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda fumigacji — ekstrakcji.
- 10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose — effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99—113.
- 11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge, London and New-York.
- 12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

Załącznik nr 12

## C.22. MIKROORGANIZMY GLEBOWE: BADANIE PRZEMIAN WĘGLA

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytocznej OECD nr 217 (2000).

#### 1.1. Wstęp

Niniejsza metoda badawcza opisuje laboratoryjną metodykę służącą do badania długoterminowych wpływów środków ochrony roślin i innych substancji chemicznych, po jednorazowym narażeniu, na aktywność mikroorganizmów glebowych w przemianach węgla. Badanie opiera się głównie na zaleceniach Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Brano również pod uwagę inne wytyczne, takie jak niemieckiego Biologicznego Urzędu Federalnego (zobacz pozycja 2 piśmiennictwa), amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska US EPA (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa) oraz SETAC (zobacz pozycja 4 piśmiennictwa). Podczas posiedzenia OECD na temat wyboru gleby/osadu w Belgirate, Włochy w 1995 r. (zobacz pozycja 5 piśmiennictwa), uzgodniono liczbę i rodzaj gleby, które można zastosować w badaniach wykonanych wg niniejszej metody. Zalecenia co do pobierania, obróbki i przechowywania próbek glebowych opierają się na Dokumencie Przewodnim ISO (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa) oraz na ustaleniach podjętych podczas spotkania roboczego w Belgirate.

Podczas określania i oceny charakterystyki toksykologicznej badanych substancji konieczne może okazać się oznaczenie ich wpływów na aktywność mikroorganizmów glebowych, np. gdy wymagane są dane dotyczące potencjalnych skutków ubocznych działania środków ochrony roślin na mikroflorę glebową lub gdy spodziewane jest narażenie mikroorganizmów glebowych na substancje chemiczne inne niż środki ochrony roślin. Badanie przemian węgla wykonuje

się, aby określić wpływy takich substancji chemicznych na mikroflorę glebową. Podczas badania agrochemikaliów (środki ochrony roślin, nawozy, chemikalia stosowane w leśnictwie) wykonuje się zarówno badanie przemian węgla, jak i badanie przemian azotu. Przy badaniach innych substancji wystarczające jest badanie przemian azotu. Jeżeli jednak wartość  $EC_{50}$  w badaniu przemian azotu dla takich substancji przyjmuje wartość zawartą w tym samym zakresie jak dla handlowo dostępnych inhibitorów nityfikacji (np. nitrapryna), to badanie przemian węgla może być wykonane celem zebrania dalszych informacji.

Gleby składają się z żywych i nieożywionych składników, które istnieją w złożonych i heterogenicznych mieszaninach. Mikroorganizmy wraz z wieloma gatunkami mającymi wkład w różne aspekty użytkowania gleby odgrywają ważną rolę w rozkładzie i przemianach materii organicznej w żyznych glebach. Długoterminowe zakłócenie tych procesów biochemicznych może potencjalnie oddziaływać na krążenie składników odżywczych i poprzez to zmieniać żyzność gleby. Przemiany węgla i azotu następują we wszystkich żyznych glebach. Chociaż zespoły mikroorganizmów odpowiedzialne za te procesy różnią się między glebami, to szlaki przemian są zasadniczo takie same.

Badanie opisane w niniejszej metodzie ma służyć wykrywaniu długoterminowych szkodliwych wpływów substancji na proces przemiany węgla w aerobowych glebach powierzchniowych. Niniejsze badanie jest wrażliwe na wszelkie zmiany wielkości i aktywności zespołów mikroorganizmów odpowiedzialnych za przemiany węgla, ponieważ poddaje te zespoły zarówno stresowi chemicznemu, jak i pozbawia je węgla. Stosowana jest gleba piaszczysta o niskiej zawartości materii organicznej. Do tej gleby dodaje się badaną substancję i inkubuje w warunkach, które pozwalają na szybki metabolizm mikroorganizmów.

W takich warunkach źródła łatwo dostępnego węgla w glebie szybko się wyczerpują. Powoduje to niedobór węgla, co zarówno zabija komórki mikroorganizmów, jak i indukuje diapauzę i/lub sporulację. Jeżeli badanie trwa dłużej niż 28 dni, to suma tych reakcji może być oznaczona w badaniu kontrolnym (gleby nietraktowane) jako postępująca utrata metabolicznie aktywnej biomasy mikroorganizmów (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Jeżeli na biomasę w glebie obciążonej węglem, w warunkach badania, ma wpływ obecność substancji chemicznej, to może ona nie powrócić do tego samego poziomu co w badaniu kontrolnym. Dlatego zakłócenia spowodowane przez badaną substancję w jakimkolwiek momencie podczas badania często będą trwały aż do jego zakończenia.

Badanie, z którego wywodzi się niniejsza metoda badawcza, było pierwotnie zaprojektowane dla substancji, których ilość w glebie można było przewidzieć. Tak jest na przykład w przypadku środków ochrony roślin, dla których znana jest ich ilość stosowana w polu. W przypadku agrochemikaliów wystarczające jest badanie dwóch dawek, jakie przewiduje się lub przypuszcza, że będą stosowane. Agrochemikalia mogą być badane jako substancje aktywne (s.a.) lub jako gotowe formy użytkowe. Jednakże niniejsze badanie nie ogranicza się tylko do substancji chemicznych o możliwym do przewidzenia stężeniu w środowisku. Zmieniając zarówno ilość badanej substancji stosowanej do gleby, jak i sposób opracowania danych, badanie może być również wykonane w przypadku substancji chemicznych, co do których nie jest znana ich spodziewana ilość w glebie. Dlatego dla substancji innych niż agrochemikalia oznacza się wpływ serii stężeń na przemiany węgla. Dane z tych badań używane są do wyznaczenia krzywej zależności dawka-odpowiedź i wyliczenia wartości  $EC_x$ , gdzie  $x$  jest zdefiniowanym % skutku.

## 1.2. Definicje

**Przemiany węgla:** to rozkład przez mikroorganizmy materii organicznej prowadzący do wytworzenia dwutlenku węgla jako produktu końcowego.

**$EC_x$  (Stężenie efektywne):** jest stężeniem badanej substancji w glebie powodującym  $x$  procent inhibicji przemian węgla do dwutlenku węgla.

**$EC_{50}$  (Medialne stężenie efektywne):** jest stężeniem badanej substancji w glebie powodującym 50 % inhibicję przemian węgla do dwutlenku węgla.

## 1.3. Substancje kontrolne

Brak.

## 1.4. Zasada metody badawczej

Do przesianej gleby dodaje się badaną substancję lub glebę pozostawia się bez dodatku badanej substancji (kontrola). Jeżeli badane są agrochemikalia, to zaleca się minimum dwa stężenia badanej substancji, które powinny być wybrane w odniesieniu do najwyższego stężenia, jakie przewiduje się w warunkach polowych. Po 0, 7, 14 i 28 dniach inkubacji próbki gleby z substan-

cją badaną i próbki gleby kontrolnej są mieszane z glukozą i po kolejnych 12 godzinach oznacza się oddychanie indukowane glukozą. Oddychanie jest wyrażone jako ilość uwolnionego dwutlenku węgla (mg dwutlenku węgla/kg suchej masy gleby/godzinę) lub ilość zużytego tlenu (mg tlenu/kg gleby/godzinę). Oddychanie w próbkach z substancją badaną jest porównywane z wartością kontrolną i oblicza się procent odchylenia względem kontroli. Wszystkie badania prowadzone są przynajmniej przez 28 dni. Jeżeli w 28 dniu różnica między próbkami kontrolnymi i próbkami z substancją badaną jest równa lub większa niż 25 %, to pomiary są kontynuowane w odstępach 14-dniowych do maksymalnie 100 dni. Jeżeli badane są substancje inne niż agrochemikalia, to do próbek gleby dodaje się substancję w stężeniach stanowiących serię, a oddychanie indukowane glukozą (tj. średnie ilości wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu) oznacza się po 28 dniach inkubacji. Wyniki badań z wieloma stężeniami analizowane są przy pomocy modelu regresji. Wyliczane są wartości  $EC_x$  (np.:  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  i/lub  $EC_{10}$ ).

## 1.5. Wiarygodność badania

Szacowanie wyników badania dla agrochemikaliów opiera się na stosunkowo małych różnicach (tj. średnia wartość  $\pm 25$  %) pomiędzy uwolnionym dwutlenkiem węgla lub zużytym tlenem w kontroli i próbkach badanych, więc duże odchylenia w kontroli mogą prowadzić do fałszywych wyników. Dlatego zmienność pomiędzy powtórzeniami w kontroli powinna wynosić mniej niż  $\pm 15$  %.

## 1.6. Opis metody badawczej

### 1.6.1. Wyposażenie

W badaniu stosuje się naczynia testowe wykonane z obojętnego chemicznie materiału. Powinny być one odpowiedniej wielkości w zależności od zastosowanej procedury inkubacji gleb, tj. inkubacji całej partii gleby lub jako seria poszczególnych próbek glebowych (zobacz pkt 1.7.1.2). Należy poczynić starania, by zminimalizować straty wody z jednej strony, a z drugiej by umożliwić wymianę gazową podczas badania (np. naczynia stosowane w badaniu mogą być nakryte perforowaną folią polietylenową). Gdy badane są substancje lotne, powinny być stosowane szczelne i nieprzepuszczalne dla gazu naczynia. Powinny one mieć takie rozmiary, by próbka gleby wypełniała w przybliżeniu jedną czwartą ich objętości.

Do oznaczenia oddychania indukowanego glukozą wymagane są układy inkubacyjne oraz urządzenia do pomiarów wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu. Przykłady takich układów i urządzeń są opisane w pozycji 8, 9, 10, 11 piśmiennictwa.

### 1.6.2. Wybór i liczba gleb

Stosowana jest gleba jednego rodzaju. Zalecana charakterystyka gleby jest następująca:

— zawartość piasku: nie mniej niż 50 % i nie więcej niż 75 %,

- wartość pH: 5,5—7,5,
- zawartość węgla organicznego: 0,5—1,5 %,
- biomasa mikroorganizmów powinna być oznaczona (zobacz pozycje 12 i 13 piśmiennictwa), a zawartość węgla powinna stanowić przynajmniej 1 % całkowitego węgla organicznego gleby.

Gleba o takich właściwościach jest najbardziej niekorzystnym przypadkiem, ponieważ adsorpcja badanej substancji jest minimalna, a jej dostępność dla mikroflory maksymalna. Dlatego badania z innymi glebami ogólnie są niepotrzebne. Jednakże w pewnych okolicznościach, np. gdy przewidywane zastosowanie badanej substancji będzie miało miejsce na szczególnie glebach, takich jak kwaśne gleby leśne lub w przypadku substancji chemicznych naładowanych elektrostatycznie, konieczne może się okazać zastosowanie dodatkowej gleby.

### 1.6.3. Pobieranie i przechowywanie próbek gleby

#### 1.6.3.1. *Pobieranie próbek gleby*

Dostępne powinny być szczegółowe informacje dotyczące historii miejsca, z którego pobierana jest gleba do badań. Podać należy dokładne miejsce, rodzaj roślinności pokrywającej, daty zastosowania środków ochrony roślin, zastosowanie nawozów organicznych i nieorganicznych, dodatki materiałów biologicznych lub przypadkowe zanieczyszczenia. Miejsce, z którego pobiera się próby gleby do badań, powinno być tak dobrane, by umożliwić długoterminowe jego użycie. Odpowiednie są pastwiska stale wypasane, pola uprawne z jednorocznymi uprawami zbóż (z wyjątkiem kukurydzy) lub gęsto zasiane zielone łąki. Miejsce wybrane do pobierania próbek nie powinno być podawane zabiegom z użyciem środków ochrony roślin przez minimum jeden rok przed pobraniem próbek. Ponadto przez przynajmniej sześć miesięcy przed pobieraniem prób nie powinno stosować się żadnego nawozu organicznego. Zastosowanie nawozu mineralnego jest możliwe tylko w przypadku wymagania tego przez rośliny uprawne, a próbki gleby nie powinny być pobierane wcześniej niż trzy miesiące po zastosowaniu nawozu. Należy unikać stosowania gleb, na których stosowano nawozy o znanych skutkach działania biologicznego (np. cyjanamid wapnia).

Należy unikać pobierania próbek podczas lub tuż po długich okresach suszy (większe niż 30 dni) lub spływów wody. W przypadku gleb ornich próbki należy pobierać z głębokości 0 do 20 cm. W przypadku łąk (pastwisk) lub innych gleb, gdzie orka nie była przeprowadzana przez długie okresy (przynajmniej jeden sezon), maksymalna głębokość pobierania próbek może wynosić nieco więcej niż 20 cm (np. do 25 cm). Probki gleby powinny być transportowane w pojemnikach i temperaturze, które gwarantują, że pierwotne właściwości gleby nie zostaną znacząco zmienione.

#### 1.6.3.2. *Przechowywanie próbek gleby*

Najbardziej właściwe jest stosowanie gleby świeżo pobranej z pola. Jeżeli jednak nie ma sposobu na

uniknięcie przechowywania w laboratorium, to gleby mogą być przechowywane w ciemności w temperaturze  $4 \pm 2$  °C przez maksimum trzy miesiące. Podczas przechowywania gleby należy zapewnić warunki tlenowe. Jeżeli gleby pobiera się z miejsc, gdzie są one zamrożone przez przynajmniej trzy miesiące w roku, to można rozważyć przechowywanie ich próbek przez sześć miesięcy w temperaturze  $-18$  °C. Biomasa mikroorganizmów w przechowywanych glebach oznacza się przed każdym doświadczeniem. Węgiel w biomacie powinien stanowić przynajmniej 1 % całkowitego węgla organicznego (zobacz pkt 1.6.2).

### 1.6.4. Obróbka i przygotowanie gleby przed badaniem

#### 1.6.4.1. *Inkubacja wstępna*

Jeżeli gleba była przechowywana (zobacz pkt 1.6.4.2 i pkt 1.7.1.3), zaleca się inkubację wstępną przez odpowiedni okres wynoszący od 2 do 28 dni. Temperatura i wilgotność gleby podczas inkubacji wstępnej powinny być podobne do tych stosowanych w badaniu (zobacz pkt 1.6.4.2 i pkt 1.7.1.3).

#### 1.6.4.2. *Parametry fizykochemiczne*

Glebę oczyszcza się ręcznie z dużych zanieczyszczeń (np. kamieni, części roślin) i następnie przesiewa do cząstek o rozmiarach równych lub mniejszych niż 2 mm. Wilgotność gleby powinna być dostosowana za pomocą wody destylowanej lub dejonizowanej do wartości pomiędzy 40 i 60 % maksymalnej pojemności wodnej.

### 1.6.5. Przygotowanie badanej substancji w celu dodania do gleby

Badaną substancję podaje się z nośnikiem. Nośnikiem może być woda (dla substancji rozpuszczalnych w wodzie) lub obojętna stała substancja, taka jak drobny piasek kwarcowy (rozmiar cząstek: 0,1—0,5 mm). Należy unikać stosowania płynnych nośników innych niż woda (np. rozpuszczalniki organiczne, takie jak aceton, chloroform), ponieważ mogą one zniszczyć mikroflorę. Jeżeli jako nośnik stosuje się piasek, to może on zawierać badaną substancję rozpuszczoną lub zawieszoną w odpowiednim rozpuszczalniku. W takich przypadkach rozpuszczalnik powinien być usunięty przez odparowanie przed wymieszaniem z glebą. Dla równomiernego rozprowadzenia badanej substancji w glebie zaleca się stosowanie 10 g piasku na kilogram gleby (sucha masa). Do próbek kontrolnych dodaje się taką samą ilość wody i/lub piasku.

Badając substancje lotne, należy na tyle, na ile to możliwe unikać strat podczas ich wprowadzania, a także należy poczynić starania, by w sposób jednorodny rozprowadzić substancję w glebie (np. substancja powinna zostać podana do gleby w kilku miejscach).

### 1.6.6. Stężenia substancji badanej

Jeżeli badane są agrochemikalia lub inne substancje chemiczne o możliwym do przewidzenia stężeniu

w środowisku, to powinny być zastosowane przynajmniej dwa stężenia. Niższe stężenie powinno odpowiadać przynajmniej maksymalnej ilości spodziewanej w glebie w warunkach praktycznych, natomiast wyższe stężenie powinno być wielokrotnością stężenia niższego. Stężenia badanej substancji dodanej do gleby oblicza się przy założeniu jednorodnego rozmieszczenia do głębokości 5 cm i gęstości gleby równej 1,5. W przypadku agrochemikaliów stosowanych bezpośrednio do gleby lub substancji chemicznych, których ilość w glebie można przewidzieć, zalecane badane stężenia to maksymalne Przewidywane Stężenie w Środowisku (PEC) i jego pięciokrotność. W przypadku substancji, które stosuje się kilkakrotnie w czasie sezonu, badane stężenia wyznacza się, mnożąc PEC przez maksymalną przewidywaną liczbę zastosowań. Jednakże najwyższe stosowane stężenie nie powinno przekraczać dziesięciokrotności maksymalnej jednorazowo zastosowanej dawki.

Jeżeli badane są substancje inne niż agrochemikalia, należy stosować geometryczną serię pięciu stężeń. Badane stężenia powinny obejmować zakres konieczny do wyznaczenia wartości  $EC_x$ .

## 1.7. Wykonanie badania

### 1.7.1. Warunki narażenia

#### 1.7.1.1. Stężenia substancji badanej i kontrola

Jeżeli badane są agrochemikalia, badaną próbkę gleby dzieli się na trzy części o równej masie. Dwie części miesza się z nośnikiem zawierającym badany produkt, a trzecią część z nośnikiem bez badanego produktu (kontrola). Zaleca się stosowanie minimum trzech powtórzeń dla stężeń i kontroli. W przypadku badania substancji innych niż agrochemikalia glebę dzieli się na sześć części o równej masie. Pięć z nich miesza się z nośnikiem zawierającym badaną substancję, a szóstą z nośnikiem bez badanej substancji. Zarówno dla kontroli, jak i badanych serii stężeń zaleca się prowadzenie trzech powtórzeń. Należy podjąć wszelkie starania w celu zapewnienia jednorodnego rozprowadzenia badanej substancji w próbkach gleby. Podczas mieszania należy unikać ubijania i zgniatania gleby.

#### 1.7.1.2. Inkubacja próbek glebowych

Inkubacja próbek glebowych może być przeprowadzona na dwa sposoby: całej partii gleby z badaną substancją i gleby kontrolnej lub z wykorzystaniem równych części poszczególnych próbek gleby kontrolnej i z badaną substancją. Jeżeli badane są substancje lotne, to badania należy prowadzić z serią poszczególnych próbek. Jeżeli inkubuje się całą partię gleby, to należy przygotować dużą ilość próbek kontrolnych i z badaną substancją, żeby podczas badania pobierać z nich małe próbki do analizy. Wyjściowa masa przygotowanej gleby pierwotnej i w stężeniach zależy od rozmiaru próbek pobieranych do analizy, liczby zastosowanych powtórzeń w analizie oraz przewidywanej maksymalnej krotności pobierania. Gleby inkubowane w całości przed pobieraniem próbek do analizy po-

winny zostać dobrze wymieszane. Jeżeli gleby są inkubowane jako poszczególne próbki, to każda z nich, zarówno kontrolna, jak i z badaną substancją dzielona jest na wymaganą liczbę mniejszych próbek i te są wykorzystywane według potrzeby. W doświadczeniach gdzie przewiduje się więcej niż dwa pobrania próbek do analizy, mniejsze próbki powinny być przygotowane w ilości wystarczającej dla wszystkich powtórzeń we wszystkich punktach czasowych pobierania próbek. Powinny być inkubowane przynajmniej trzy powtórzenia badanej gleby w warunkach tlenowych (zobacz pkt 1.7.1.1). Podczas wszystkich badań stosowane powinny być odpowiednie pojemniki o powierzchni pozwalającej na uniknięcie rozwoju warunków bez-tlenowych. Jeżeli badane są substancje lotne, badania należy prowadzić z serią poszczególnych próbek.

#### 1.7.1.3. Warunki i czas trwania badania

Badanie jest wykonywane w ciemności w temperaturze pokojowej  $20 \pm 2$  °C. Wilgotność próbek gleby powinna być utrzymywana w czasie badania pomiędzy 40 % a 60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zobacz pkt 1.6.4.2) z odchyleniem  $\pm 5$  %. W miarę potrzeby można dodać wodę destylowaną lub dejonizowaną.

Minimalny czas trwania badania wynosi 28 dni. Jeżeli badane są agrochemikalia, to porównywane są ilości uwolnionego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu w próbkach kontrolnych i z badaną substancją. Jeżeli w 28 dniu różnią się one o więcej niż 25 %, to badanie jest kontynuowane, aż osiągnie się różnicę równą lub mniejszą niż 25 % lub przez maksimum 100 dni w zależności od tego, co nastąpi wcześniej. Dla substancji innych niż agrochemikalia badanie kończy się po 28 dniach. Po 28 dniach w próbkach kontrolnych i gleby z badaną substancją oznacza się ilość uwolnionego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu i oblicza wartości  $EC_x$ .

### 1.7.2. Pobieranie próbek i analiza gleb

#### 1.7.2.1. Terminy pobierania próbek gleby

Jeżeli bada się agrochemikalia, to próbki gleby do analizy oddychania indukowanego glukozą pobiera się w 0, 7, 14 i 28 dniu. Jeżeli konieczne jest przedłużenie badania, dalsze pomiary powinny być wykonywane w odstępach 14-dniowych po 28 dniu.

Jeżeli bada się substancje inne niż agrochemikalia to należy stosować przynajmniej pięć stężeń, a oddychanie indukowane glukozą w próbkach glebowych oznacza się na początku (dzień 0) i na koniec okresu narażenia (28 dzień). Dodatkowy pomiar np. w 7 dniu może być również wykonany, jeżeli zostanie to uznane za konieczne. Dane otrzymane 28 dnia są używane do wyznaczenia wartości  $EC_x$  dla substancji chemicznej. Jeżeli jest to wymagane, to dane z próbek kontrolnych z dnia 0 mogą zostać wykorzystane do podania początkowej ilości metabolicznie aktywnej biomasy mikroorganizmów w glebie (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa).



### 1.7.2.2. Oznaczanie oddychania indukowanego glukozą

Oddychanie indukowane glukozą w każdym powtórzeniu próbek z badaną substancją i kontroli oznacza się za każdym razem podczas pobierania próbek. Próbkę gleby miesza się z odpowiednią ilością glukozy, by wywołać natychmiastową maksymalną reakcję oddychania. Ilość glukozy potrzebna do wywołania maksymalnej reakcji oddychania dla danej gleby może być oznaczona w badaniu wstępnym przy zastosowaniu serii stężeń glukozy (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa). Zazwyczaj ilością wystarczającą w przypadku gleby piaszczystej o 0,5—1,5 % zawartości węgla organicznego jest 2000 mg do 4000 mg glukozy na kg suchej masy gleby. Glukoza może być zmielona do postaci proszku z czystym piaskiem kwarcowym (10 g piasku/kg suchej masy gleby) i w sposób jednorodny wymieszana z glebą.

Próbki gleby z dodaną glukozą są inkubowane w odpowiednim urządzeniu do ciągłego pomiaru oddychania, co godzinę lub co dwie godziny (zobacz pkt 1.6.1) w temperaturze  $20 \pm 2$  °C. Przez kolejnych 12 godzin oznacza się ilość wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu, a pomiary powinny zacząć się jak najwcześniej, tj. w ciągu 1 do 2 godzin po dodaniu glukozy. Podczas 12 godzin mierzy się całkowite ilości wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu i oznacza się średnią wartość oddychania.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Obliczanie wyników

Jeżeli badanie wykonuje się z agrochemikaliami, to ilość wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu w każdej próbce powinna być zapisana, a średnie wartości ze wszystkich powtórzeń powinny zostać zestawione w formie tabeli. Wyniki powinny zostać oszacowane za pomocą odpowiedniej i ogólnie uznanej metody statystycznej (np. test F, poziom istotności 5 %). Oddychanie indukowane glukozą wyraża się w mg dwutlenku węgla/kg suchej masy gleby/godzinę lub w mg tlenu/kg suchej masy gleby/godzinę. Średnią ilość wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu w każdym stężeniu porównuje się z ilością w glebie kontrolnej i oblicza się procent odchylenia względem kontroli.

Jeżeli badanie wykonywane jest dla substancji innych niż agrochemikalia, to określa się ilość wytworzonego dwutlenku węgla lub zużytego tlenu w każdym powtórzeniu i dla oszacowania wartości  $EC_x$  wyznacza się krzywą zależności dawka-odpowiedź. Oddychanie indukowane glukozą (tj. mg dwutlenku węgla/kg suchej masy gleby/godzinę lub w mg tlenu/kg suchej masy gleby/godzinę) oznaczone w próbkach z badaną substancją po 28 dniach jest porównywane z kontrolą. Z tych danych oblicza się procent inhibicji dla każdego stężenia. Wartości wyrażone w procentach należy korelować z odpowiednimi stężeniami. Procedury statystyczne powinny umożliwić obliczenie wartości  $EC_x$ . Przy zastosowaniu standardowych pro-

cedur (zobacz pozycje 15, 16 i 17 piśmiennictwa) dla obliczonych wartości  $EC_x$  wyznacza się także przedziały ufności ( $p=0,95$ ).

### 2.2. Interpretacja wyników

Jeżeli szacuje się wyniki z badania agrochemikalii, a różnica w oddychaniu pomiędzy niższą dawką (tj. maksymalnym przewidywanym stężeniem w środowisku) a kontrolą jest równa lub niższa niż 25 % w jakimkolwiek czasie pobierania próbki po 28 dniach, to produkt może zostać scharakteryzowany jako niemający długoterminowego wpływu na przemiany węgla w glebie. Przy szacowaniu wyników z badań substancji innych niż agrochemikalia stosuje się wartości  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  i/lub  $EC_{10}$ .

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Dokładna identyfikacja stosowanej gleby:

- umiejscowienie geograficzne (długość, szerokość),
- informacje o historii miejsca (tj. rodzaj roślinności pokrywającej, zastosowane środki ochrony roślin, nawozy, przypadkowe zanieczyszczenia itp.),
- zastosowanie gleby (gleba rolnicza, leśna itp.),
- głębokość pobierania gleby (cm),
- zawartość piasku/iłu/gliny (% suchej masy),
- wartość pH (w wodzie),
- zawartość węgla organicznego (% suchej masy),
- zawartość azotu (% suchej masy),
- początkowe stężenie azotanów (mg azotanów/kg suchej masy),
- zdolność wymiany jonowej (mmol/kg),
- biomasa mikroorganizmów wyrażona w procentach całkowitej zawartości węgla organicznego,
- metody stosowane do oznaczenia każdego parametru,
- wszystkie informacje dotyczące pobierania i przechowywania próbek,
- szczegóły dotyczące wstępnej inkubacji gleby.

Badana substancja:

- postać fizyczna i istotne właściwości fizykochemiczne,
- nazwa chemiczna oraz wzór strukturalny, czystość (tj. dla środków ochrony roślin procent substancji aktywnej), zawartość azotu.



**Warunki badania:**

- szczegóły dotyczące wzbogacenia gleby substratem organicznym,
- liczba stężeń badanej substancji i uzasadnienie wyboru stężeń,
- szczegóły dotyczące podania badanej substancji do gleby,
- temperatura inkubacji,
- wilgotność gleby na początku i podczas trwania badania,
- zastosowana metoda inkubacji gleby (cała partia gleby, czy jako seria poszczególnych próbek gleby),
- informacja o tym, ile razy pobierano próbki,
- czas pobrania próbek.

**Wyniki:**

- metoda i sprzęt stosowany do pomiarów respiracji,
- dane zawierające poszczególne wyniki i wartości średnie pomiarów dwutlenku węgla lub tlenu w formie tabel,
- odchylenia pomiędzy powtórzeniami w próbkach z badaną substancją i kontrolnych,
- wyjaśnienia poprawek w obliczeniach, jeżeli były konieczne,
- odchylenia w oddychaniu indukowanym glukozą w każdym czasie pobierania próbek wyrażone w procentach lub w postaci wartości  $EC_{50}$  z 95 % przedziałami ufności, inne wartości  $EC_x$  (tj.  $EC_{25}$  lub  $EC_{10}$ ) z przedziałami ufności oraz wykres krzywej zależności dawka-odpowiedź,
- statystyczne opracowanie wyników, jeżeli jest konieczne,
- wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

**4. PIŚMIENNICTWO**

- 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 (2<sup>nd</sup> 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. PN-ISO 10381-6:1998 Jakość gleby — Pobieranie próbek — Zasady dotyczące pobierania, postępowania z próbkami i przechowywania próbek gleby przeznaczonych do badania tlenowych (aerobowych) procesów mikrobiologicznych w warunkach laboratoryjnych.
- 7) Anderson J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticides Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora”. Eds. L. Somerville and M. P. Greaves, Chap. 3: 45—60.
- 8) Anderson J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph N° 9. Eds. A. L. Page, R.H. Miller and D. R. Keeney. 41: 831—871.
- 9) ISO 11266-1 (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions. PN-ISO 11266:1997 Jakość gleby — Zasady prowadzenia badań laboratoryjnych nad biodegradacją związków organicznych w glebie w warunkach tlenowych.
- 10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring mineralisations of organic chemicals in soil under aerobic conditions. PN-ISO 14239:2000 Jakość gleby — Laboratoryjne metody inkubacji do pomiaru mineralizacji związków organicznych w glebie w warunkach tlenowych.
- 11) Heinemeyer O., Insam H., Kaiser E. A. and Walenzik G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77—81.
- 12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate — induced respiration method. PN-ISO 14240-1:2001 Jakość gleby — Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda indukcji oddychania przez dodanie substratu.
- 13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of microbial biomass — Part 2: Fumigation — extraction method. PN-ISO 14240-2:2001 Jakość gleby — Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda fumigacji — ekstrakcji.
- 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. 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge, London and New York.
- 17) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

Załącznik nr 13

## C.23. PRZEMIANY TLENOWE I BEZTLENOWE W GLEBIE

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 307 (2002).

#### 1.1. Wstęp

Niniejsza metoda badawcza opiera się na istniejących wytycznych (zobacz pozycje 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9 piśmiennictwa). Badanie wykonane wg niniejszej metody ma na celu oszacowanie tlenowych i beztlenowych przemian substancji chemicznych w glebie. Doświadczenie wykonuje się, aby określić (i) stopień przemian badanej substancji i (ii) rodzaj i ilości powstających i ulegających rozkładowi produktów przemian, na które mogą być narażone organizmy glebowe i rośliny. Takie badania są wymagane dla substancji chemicznych bezpośrednio stosowanych do gleby lub dla tych, które z dużym prawdopodobieństwem osiągną środowisko glebowe. Wyniki takich badań laboratoryjnych mogą być także wykorzystane przy opracowywaniu metod pobierania próbek i ich analizy w badaniach polowych.

Badania tlenowe i beztlenowe przeprowadzane na jednym rodzaju gleby są na ogół wystarczające do oszacowania szlaków przemian (zobacz pozycje 8, 10 i 11 piśmiennictwa). Stopień przemian powinien być oszacowany przynajmniej w trzech rodzajach gleb (zobacz pozycje 8 i 10 piśmiennictwa).

Na Warsztatach OECD dotyczących wyboru gleb i osadów, które odbywały się we Włoszech, Belgirate w 1995 r. (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa), uzgodniono liczbę i rodzaje gleb, które mogą być stosowane w badaniu. Rodzaje badanych gleb powinny być reprezentatywne dla regionu, w którym nastąpi zastosowanie lub uwolnienie substancji. Na przykład substancje, które będą stosowane w regionach tropikalnych i subtropikalnych, powinny być badane na glebach typu Ferrasol i Nitosol (według klasyfikacji FAO). Na Warsztatach podjęto także zalecenia w zakresie pobierania, opracowania i przechowywania próbek glebowych na bazie Wytycznych ISO (zobacz pozycja 15 piśmiennictwa). W metodzie uwzględnia się także stosowanie gleb spod upraw ryżowych.

#### 1.2. Definicje

**Badana substancja:** każda substancja, w tym związek wyjściowy i odpowiednie produkty przemian.

**Produkty przemian:** wszystkie substancje pochodzące z reakcji przemian biotycznych lub abiotycznych badanej substancji, w tym CO<sub>2</sub> i produkty, które są w związanych pozostałościach.

**Związane pozostałości:** „Związane pozostałości” stanowią związki w glebie, roślinie lub zwierzęciu, które trwają w matrycy w postaci związku wyjściowego lub jego metabolitów/produktów przemian po ekstrakcji. Metoda ekstrakcji nie powinna znacząco zmieniać samych związków lub struktury matrycy. Sposób wiązania może być częściowo wyjaśniony przez zmianę sposobu ekstrakcji z matrycy lub wyspecjalizowane techniki analityczne. W taki sposób zidentyfikowano na przykład wiązania kowalencyjne jonowe i sorpcyjne, a także „pułapki”. Ogólnie tworzenie związanych pozostałości redukuje znacząco biodostępność i bioprzystępność (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa) [zmodyfikowane według IUPAC 1984 r. (zobacz pozycja 13 piśmiennictwa)].

**Przemiany tlenowe:** reakcje zachodzące w obecności tlenu cząsteczkowego (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa).

**Przemiany beztlenowe:** reakcje zachodzące pod nieobecność tlenu cząsteczkowego (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa).

**Gleba:** jest mieszaniną mineralnych i chemicznych organicznych składników, przy czym te drugie składają się ze związków o wysokiej zawartości węgla i azotu i o dużych masach cząsteczkowych, ożywionych przez małe (najczęściej mikro-) organizmy. Gleby mogą znajdować się w dwóch stanach:

- niewzruszony, czyli tak jak gleba rozwijała się w czasie z charakterystycznymi powłokami różnych jej rodzajów,
- wzruszony, czyli taki, który dotyczy gleb uprawianych lub wtedy gdy pobiera się próbki przez wykopywanie i stosuje w niniejszej metodzie (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa).

**Mineralizacja:** jest pełnym rozkładem związku organicznego do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O w warunkach tlenowych oraz CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O w warunkach beztlenowych. W kontekście niniejszej metody gdy stosuje się związek znakowany <sup>14</sup>C, mineralizacja oznacza rozkład,

podczas którego znakowany atom węgla jest utleniany z uwolnieniem odpowiedniej ilości  $^{14}\text{CO}_2$  (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa).

**Okres półrozpadu:**  $t_{0,5}$  jest czasem potrzebnym na zajście 50 % przemian badanej substancji, jeżeli przemiany można opisać kinetyką pierwszego rzędu; czas ten nie zależy od stężenia.

**DT<sub>50</sub> (Okres Zanikania 50):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 50 %; jest inne od okresu półrozpadu  $t_{0,5}$ , gdy przemiany nie następują według kinetyki pierwszego rzędu.

**DT<sub>75</sub> (Okres Zanikania 75):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 75 %.

**DT<sub>90</sub> (Okres Zanikania 90):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 90 %.

### 1.3. Substancje kontrolne

Substancje kontrolne powinny być stosowane w celu charakteryzacji i/lub identyfikacji produktów przemian metodami spektroskopowymi lub chromatograficznymi.

### 1.4. Zastosowanie badania

Metoda ma zastosowanie dla wszystkich substancji chemicznych (nieznakowanych lub znakowanych), dla których istnieje metoda analityczna o odpowiedniej czułości i dokładności. Badanie stosuje się dla związków o niewielkiej lotności, nielotnych, rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie. Badania nie należy wykonywać dla substancji o wysokiej lotności z gleby (np.: fumiganty, rozpuszczalniki organiczne), których nie można utrzymać w glebie w warunkach doświadczalnych badania.

### 1.5. Informacje o badanej substancji

Dla pomiaru stopnia przemian stosować można substancje znakowane i nieznakowane. Materiał znakowany jest wymagany do badania szlaków przemian i ustalania bilansu masy. Zalecane jest znakowanie  $^{14}\text{C}$ , ale zastosowanie innych izotopów, takich jak  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ , także może być użyteczne.

Na tyle, na ile to możliwe, znacznik powinien być umiejscowiony w najbardziej stabilnej części cząsteczki<sup>11</sup>. Czystość badanej substancji powinna wynosić przynajmniej 95 %.

Przed wykonaniem badania przemian tlenowych i beztlenowych w glebie na temat badanej substancji powinny być dostępne następujące informacje:

- rozpuszczalność w wodzie (wg Metody A.6),
- rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych,
- prężność par (wg metody A.4) i stała Henry'ego,
- współczynnik podziału n-oktanol/woda (wg metody A.8),
- trwałość chemiczna w ciemności (hydroliza) (wg metody C.7),
- wartość  $\text{pK}_a$ , jeżeli substancja jest podatna na protonowanie lub deprotonowanie [Wytyczna OECD nr 112] (zobacz pozycja 16 piśmiennictwa).

Inne użyteczne informacje to dane o toksyczności badanej substancji dla mikroorganizmów glebowych [wg metod badawczych C.21 i C.22], zobacz pozycja 16 piśmiennictwa.

Dostępne powinny być metody analityczne (w tym metody ekstrakcji i oczyszczania) dla ilościowego oznaczania i identyfikacji badanej substancji i jej produktów przemian.

### 1.6. Zasada metody badawczej

Próbki gleby poddaje się działaniu badanej substancji i inkubuje w ciemności w kolbkach biometrycznych lub w systemach przepływowych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (w stałej temperaturze i wilgotności gleby). Po odpowiednich odstępach czasowych próbki gleby poddaje się procesowi ekstrakcji i oznacza się substancję wyjściową i produkty przemian. Produkty lotne zbiera się do analizy przy użyciu odpowiednich urządzeń absorpcyjnych. Stosując materiał znakowany  $^{14}\text{C}$ , można zmierzyć różne stopnie mineralizacji badanej substancji przez związanie uwolnionego  $^{14}\text{CO}_2$  i bilans masy, w tym tworzenie związanych pozostałości.

### 1.7. Kryteria jakości

#### 1.7.1. Odzysk

Ekstrakcja i analiza przynajmniej podwójnych próbek gleby tuż po dodaniu badanej substancji do gleby daje pierwsze wskazówki co do powtarzalności metody analitycznej i jednorodności zaaplikowania badanej substancji do gleby. Odzyski dla dalszych faz badania można ustalić przez odpowiednie bilansy mas. Odzysk powinien mieścić się w granicach 90 % do 110 % dla substancji znakowanych (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa) i 70 % do 110 % dla substancji nieznakowanych (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa).

#### 1.7.2. Powtarzalność i czułość metody analitycznej

Powtarzalność metody analitycznej (z wyłączeniem wydajności początkowej ekstrakcji) w ilościowym oznaczaniu substancji i produktów przemian można sprawdzić przez podwójną analizę tego samego ekstraktu glebowego inkubowanego na tyle długo, aby powstały produkty przemiany.

<sup>11</sup> Na przykład jeżeli badana substancja zawiera jeden pierścień, wymagane jest znakowanie w tym pierścieniu; jeżeli badana substancja zawiera dwa lub więcej pierścieni, to konieczne mogą okazać się dodatkowe badania celem określenia losu każdego znakowanego pierścienia, aby uzyskać odpowiednie informacje o tworzeniu produktów przemian.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej badanej substancji i produktów przemiany powinna wynosić przynajmniej 0,01 mg/kg gleby (jako badana substancja) lub 1 % zastosowanej dawki, w zależności która z wartości jest niższa. Powinno się także określić granicę oznaczalności (LOQ).

### 1.7.3. Dokładność danych przemian

Analiza regresji stężeń badanej substancji jako funkcja czasu daje właściwą informację o wiarygodności krzywej przemian i pozwala na obliczenie przedziałów ufności dla okresów półrozkładu (w przypadku reakcji zachodzącej wg kinetyki pseudopierwszego rzędu) lub wartości  $DT_{50}$  i, jeżeli to właściwe, także wartości  $DT_{75}$  i  $DT_{90}$ .

## 1.8. Opis metody badawczej

### 1.8.1. Sprzęt i odczynniki

Systemy inkubacyjne składają się z układów statycznych zamkniętych lub z odpowiednich układów przepływowych (zobacz pozycje 7 i 17 piśmiennictwa). Przykłady układów przepływowych dla gleby i biometrycznych kolb przedstawiono odpowiednio na rysunkach C.23.1 i C.23.2. Obydwa rodzaje systemów inkubacji mają swoje wady i zalety (zobacz pozycje 7 i 17 piśmiennictwa).

Wymagany jest standardowy sprzęt laboratoryjny, a w szczególności:

- instrumenty analityczne, takie jak GLC, HPLC, TLC wraz z odpowiednimi systemami detekcji do analizowania substancji znakowanych lub nieznakowanych lub do metody rozcieńczeń inwertowanych izotopów,
- instrumenty dla celów identyfikacyjnych (np. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR),
- licznik scyntylicyjny,
- utleniacz dla spalania materiału radioaktywnego,
- wirówka,
- sprzęt do ekstrakcji (na przykład probówki wirówkowe do zimnej ekstrakcji i aparat Soxhleta do metody ekstrakcji ciągłej),
- sprzęt do zatężania roztworów i ekstraktów (np. wyparka obrotowa),
- łaźnia wodna,
- urządzenia do mieszania mechanicznego.

Stosowane odczynniki chemiczne to na przykład:

- NaOH czystości analitycznej, 2 mol/dm<sup>3</sup> lub inna właściwa zasada (np. KOH, etanoloamina),
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> czystości analitycznej, 0,05 mol/dm<sup>3</sup>,
- glikol etylenowy czystości analitycznej,

- materiały do absorpcji na ciało stałe, takie jak poliuretany lub wapno sodowe,
- rozpuszczalniki analityczne czystości analitycznej, takie jak aceton, metanol itp.,
- ciecz do scyntytacji.

### 1.8.2. Zastosowanie badanej substancji

W celu dodania do gleby i rozprowadzenia w niej badanej substancji należy tę substancję rozpuścić w wodzie (dejonizowanej lub destylowanej) lub gdy to konieczne w minimalnej ilości acetonu lub innych rozpuszczalników organicznych (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa), w których badana substancja jest wystarczająco rozpuszczalna i trwała. Jednakże ilość wykrywanego rozpuszczalnika nie powinna mieć znaczącego wpływu na aktywność mikrobiologiczną gleby (zobacz pkt 1.5 i pkt 1.9.2—1.9.3). Należy unikać stosowania rozpuszczalników hamujących aktywność mikrobiologiczną, takich jak chloroform, dichlorometan i inne rozpuszczalniki halogenowane.

Badana substancja może być także dodana w postaci ciała stałego, np.: zmieszana z piaskiem kwarcowym (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa) lub w małej próbce gleby, która została wysuszona na powietrzu i wyjałowiona. Jeżeli badaną substancję dodaje się za pomocą rozpuszczalnika, to należy doprowadzić do wyparowania rozpuszczalnika przed dodaniem do próbki gleby i następnie do całej niesterylnej gleby do badania.

Dla ogółu substancji chemicznych, których główny szlak dostawania się do gleby to osady ściekowe/działalność rolnicza, badaną substancję powinno się najpierw dodać do osadu, a następnie wprowadzić do próbki gleby (zobacz pkt 1.9.2 i pkt 1.9.3).

Nie zaleca się stosowania produktów w postaci gotowych formulacji. Jednak w przypadku substancji o słabej rozpuszczalności zastosowanie materiału w formulacji może być właściwą alternatywą.

### 1.8.3. Gleby

#### 1.8.3.1. Wybór gleby

Aby określić szlak przemian, stosować można glebę reprezentatywną; zalecane jest stosowanie gleby piaszczysto-ilastej lub gliniasto-ilastej, lub ilastej, lub ilasto-piaszkowej [według klasyfikacji FAO i USDA (zobacz pozycja 18 piśmiennictwa)] o wartości pH w granicach 5,5—8,0, zawartości węgla organicznego 0,5—2,5 % i masie mikroorganizmów przynajmniej odpowiadającej 1 % ogólnego węgla organicznego (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

W badaniach stopnia przemian stosować należy przynajmniej trzy dodatkowe rodzaje gleb, reprezentatywne dla zakresu odpowiednich gleb. Gleby powinny różnić się co do zakresu zawartości węgla organicznego, wartości pH, zawartości gliny i mikroorganizmów (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa).

Wszystkie gleby powinny być scharakteryzowane przynajmniej pod względem struktury (% zawartość piasku, % zawartość iltu, % zawartość gliny) [według klasyfikacji FAO i USDA, zobacz pozycja 18 piśmiennictwa], wartości pH, zdolności wymiany kationów, zawartość węgla organicznego, gęstości, cech retencji wody<sup>12</sup> oraz biomasy mikroorganizmów (tylko w przypadku badań tlenowych). Dodatkowe informacje o właściwościach gleby mogą być użyteczne podczas interpretacji wyników. Dla określania cech gleby można stosować metody podane w piśmiennictwie (zobacz pozycje 19, 20, 21, 22 i 23 piśmiennictwa). Biomase mikroorganizmów powinno się oznaczać metodą oddychania indukowanego substratem (SIR) (zobacz pozycje 25 i 26 piśmiennictwa) lub metodami alternatywnymi (zobacz pozycja 20 piśmiennictwa).

### 1.8.3.2. Pobieranie, opracowanie i przechowywanie gleb

Dostępne powinny być szczegółowe informacje o historii miejsca, z którego pobiera się glebę do badań. Do szczegółów tych zalicza się dokładną lokalizację miejsca, pokrywą wegetacyjną, zabiegi chemiczne, zabiegi z zastosowaniem nawozów organicznych i nieorganicznych, dodawanie materiałów biologicznych lub informacje o innych zanieczyszczeniach. Jeżeli do gleb, w ciągu ostatnich czterech lat, dodawana była badana substancja lub jej strukturalne pochodne, to gleby te nie powinny być stosowane do badania przemian (zobacz pozycje 10 i 15 piśmiennictwa).

Gleba powinna być świeżo pobrana z pola (z przekroju A lub z górnej 20 cm warstwy) przy zawartości wody pozwalającej na przesiewanie. Dla wszystkich gleb z wyjątkiem uzyskanych z pól ryżowych pobieranie nie powinno być wykonywane podczas lub tuż po długich okresach (>30 dni) suszy, zmarznięcia lub zalania (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa). Próbkę powinny być transportowane w sposób minimalizujący zmiany w zawartości wody w glebie i trzymane w ciemności z wolnym dostępem powietrza na tyle, na ile to możliwe. Na ogół odpowiednim do tych celów jest luźno zawiązany worek polietylenowy.

Gleba powinna być poddana obróbce jak najszybciej po pobraniu. W celu usunięcia małych kamieni, fauny i pozostałości roślin należy, przed przesiewaniem przez sito o oczkach 2 mm, usunąć ręcznie roślinność, większe kamienie i faunę. Należy unikać nadmiernego wysuszenia i rozdrobnienia gleby przed przesiewaniem (zobacz pozycja 15 piśmiennictwa).

Gdy pobieranie gleby w zimie jest trudne (gleba zamrznięta lub pokryta śniegiem), to można pobierać ją partiami z gleby przechowywanej w szklarni pod pokrywą roślin (np. trawą lub mieszaniną trawy i koniczy-

ny). Zaleca się, aby badania były wykonane na świeżo pobranej glebie; ale jeżeli pobrana i obrobiona gleba musi być przechowywana przed badaniem, to powinno się zapewnić do tego odpowiednie warunki i jest to możliwe tylko przez ograniczony czas ( $4 \pm 2$  °C przez maksimum trzy miesiące) tak, by utrzymać aktywność mikrobiologiczną<sup>13</sup>. Szczegółowe informacje dotyczące pobierania, obróbki i przechowywania gleb stosowanych w badaniach biotransformacji można znaleźć w pozycjach 8, 10, 15, 26 i 27 piśmiennictwa.

Przed obrobeniem gleby, która będzie stosowana w badaniu, powinna być ona preinkubowana tak, aby wykiełkowały nasiona i można je było usunąć, a następnie ponownie ustaliła się równowaga metabolizmu mikrobiologicznego po zmianie warunków z pobierania lub przechowywania na warunki inkubacyjne. Okres preinkubacji trwający pomiędzy 2 a 28 dni w warunkach temperatury i wilgotności zbliżonych do warunków doświadczenia jest na ogół wystarczający (zobacz pozycja 15 piśmiennictwa). W sumie czas przechowywania i preinkubacji nie powinien przekraczać trzech miesięcy.

## 1.9. Wykonanie badania

### 1.9.1. Warunki doświadczenia

#### 1.9.1.1. Temperatura doświadczenia

Podczas całego okresu doświadczenia gleby powinny być inkubowane w ciemności w stałej temperaturze odpowiedniej dla warunków klimatycznych, w których stosowana lub uwolniona będzie badana substancja. Zaleca się stosowanie temperatury  $20 \pm 2$  °C dla wszystkich substancji chemicznych, które mogą być stosowane i uwolnione do gleb klimatu umiarkowanego. Temperatura powinna być monitorowana. Dla substancji chemicznych, które mogą być stosowane i uwolnione do gleb w klimacie zimniejszym (np. kraje północne, podczas okresów jesienno-zimowych), dodatkowe próbki gleby powinny być inkubowane w niższej temperaturze (np.  $10 \pm 2$  °C).

#### 1.9.1.2. Zawartość wilgoci

W badaniach przemian w warunkach tlenowych zawartość wilgoci w glebie<sup>14</sup> powinna być dostosowana i utrzymywana w zakresie pF od 2,0 do 2,5 (zobacz pozycja 3 piśmiennictwa). Zawartość wilgoci jest wyrażana jako masa wody przypadająca na masę suchej

<sup>12</sup> Retencja wody w glebie może być zmierzona jako wydajność polowa, jako pojemność wodna lub jako napięcie ssania wody (pF). Wyjaśnienia podano w tabeli C.23.1. W sprawozdaniu końcowym należy podać, czy cechy retencji wody i gęstość ogólna gleby były określone w próbkach polowych gleby niewzruszonej lub w próbkach gleby wzruszonej (obrabianej).

<sup>13</sup> Wyniki najnowszych badań wykazują, że gleby ze strefy klimatu umiarkowanego mogą być przechowywane w  $-20$  °C przez więcej niż trzy miesiące (zobacz pozycje 28, 29 piśmiennictwa) bez znaczącej utraty ich aktywności mikrobiologicznej.

<sup>14</sup> Gleba nie powinna być zbyt wilgotna ani też zbyt sucha, by utrzymać odpowiednie natlenienie i status odżywczy dla mikroflory glebowej. Zalecana zawartość wilgoci optymalna dla wzrostu mikroorganizmów mieści się w zakresie 40—60 % pojemności wodnej i od 0,1 do 0,33 bar (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa). Ten drugi zakres odpowiada zakresowi pF od 2,0 do 2,5. Typowe zawartości wilgotności różnych gleb podano w tabeli C.23.2.

gleby i powinna być regularnie kontrolowana (np. w dwutygodniowych odstępach) przez ważenie kolbek inkubacyjnych, a straty wody kompensowane przez jej dodawanie (najlepiej stosować wodę kranową wyjątkowo metodą filtracji). Należy podjąć wszelkie starania, aby zminimalizować straty badanej substancji i/lub produktów przemian przez ułatwienie i/lub fotodegradację (jeżeli występuje) podczas regulowania wilgotności.

W przypadku badań w warunkach beztlenowych i poletka ryżowego gleba jest nasycona wodą przez zalanie.

#### 1.9.1.3. Warunki inkubacji tlenowej

W systemach przepływowych warunki tlenowe są utrzymywane przez przerywane przepływy lub ciągłe napowietrzanie nawilgoconym powietrzem. W kolbach biometrycznych wymiana powietrza następuje przez dyfuzję.

#### 1.9.1.4. Jałowe warunki tlenowe

Dla uzyskania informacji o istotności przemian abiotycznych badanej substancji próbki gleby mogą być wyjątkowo (metody sterylizacji podano w pozycji 16 i 29 piśmiennictwa), traktowane jałową badaną substancją (np. podanie roztworu przez sterylny filtr) i napowietrzane sterylnym nawilgoconym powietrzem, jak opisano w pkt 1.9.1.3. W przypadku gleb z poletek ryżowych sterylizowana powinna być gleba i woda, a inkubacja powinna być przeprowadzona jak podano w pkt 1.9.1.6.

#### 1.9.1.5. Warunki inkubacji beztlenowej

W celu stworzenia i utrzymania warunków beztlenowych gleba poddana działaniu badanej substancji i inkubowana w warunkach tlenowych przez 30 dni lub okres półroczu lub  $DT_{50}$  (w zależności, która z tych wartości jest krótsza) jest następnie zalewana wodą (pokrywa wodna 1–3 cm), a system inkubacyjny przemiany strumieniem obojętnego gazu (np. azot lub argon)<sup>15</sup>. System badawczy musi umożliwiać pomiar wartości pH, stężenia tlenu i potencjału red-oks oraz zawierać materiały do pochłaniania produktów lotnych. System biometryczny powinien być zamknięty tak, aby uniknąć wnikania powietrza przez dyfuzję.

#### 1.9.1.6. Warunki inkubacji gleb poletka ryżowego

Dla zbadania przemian w warunkach poletka ryżowego glebę zalewa się 1–5 cm pokrywą wodną, a badaną substancją podaje się do fazy wodnej (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa). Zaleca się przynajmniej

<sup>15</sup> Warunki tlenowe są dominującymi w glebach powierzchniowych, a nawet w glebach podpowierzchniowych jak wykazano w projekcie finansowanym przez UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in sub-soils: 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]. Warunki beztlenowe mogą wystąpić okresowo podczas zalania gleb po dużych opadach lub na polach ryżowych.

5 cm warstwę gleby. System powinien być wentylowany powietrzem tak, jak w warunkach tlenowych. Wartość pH, stężenie tlenu i potencjał red-oks warstwy wodnej powinien być monitorowany i przedstawiony w sprawozdaniu. Przed rozpoczęciem badania przemian konieczny jest przynajmniej dwutygodniowy okres preinkubacji (zobacz pkt 1.8.3.2).

#### 1.9.1.7. Czas trwania badania

Badania stopnia i szlaków przemian w zasadzie nie powinny przekraczać 120 dni (zobacz pozycje 3, 6 i 8 piśmiennictwa)<sup>16</sup>, ponieważ po tym czasie w sztucznym układzie laboratoryjnym izolowanym od środowiska należy spodziewać się spadku aktywności biomasy mikroorganizmów glebowych. Jeżeli konieczne jest ustalenie rozpadu badanej substancji oraz tworzenia i rozpadu głównych produktów przemian, to badanie może być kontynuowane przez dłuższe okresy (np. 6 lub 12 miesięcy) (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Stosowanie dłuższych okresów inkubacji należy uzasadnić w sprawozdaniu; należy jednocześnie prowadzić pomiary biomasy podczas tego okresu i na jego zakończenie.

#### 1.9.2. Wykonanie badania

Okolo 50 do 200 g gleby (sucha masa) umieszcza się w każdej kolbce inkubacyjnej (zobacz rysunki C.23.1 i C.23.2 w Schemacie) oraz gleby traktowane badaną substancją jedną z metod opisanych w pkt 1.8.2. Gdy podczas podawania badanej substancji stosuje się rozpuszczalniki organiczne, to należy je usunąć z gleby przez odparowanie. Następnie gleba jest dokładnie mieszana szpatułką i/lub przez wytrząsanie kolbki. Jeżeli badanie jest wykonywane w warunkach poletka ryżowego, to gleba i woda powinny być dokładnie wymieszane po dodaniu badanej substancji. W celu upewnienia się o jednorodnym rozproszeniu małe ilości gleby traktowanej (np. 1 g) powinny być analizowane na zawartość badanej substancji. Alternatywna metoda podana jest poniżej.

Dawka substancji powinna odpowiadać najwyższej zalecanej dawce środka ochrony roślin. Substancja powinna być jednorodnie rozprowadzona na właściwą głębokość w warunkach polowych (np. górna powłoka 10 cm gleby<sup>17</sup>). Na przykład, dla substancji

<sup>16</sup> Badania tlenowe można zakończyć dużo wcześniej niż 120 dni, pod warunkiem że wyraźnie osiągnięto ostateczną przemianę i mineralizację. Zakończenie badania jest możliwe po 120 dniach lub gdy przemianie uległo przynajmniej 90 % badanej substancji, ale tylko jeżeli powstało przynajmniej 5 %  $CO_2$ .

<sup>17</sup> Obliczenie początkowego stężenia na podstawie arealu według równania:

$$C_{gleba} [mg/kg_{gleba}] = \frac{A [kg/ha] \cdot 10^6 [mg/kg]}{[m] \cdot 10^4 [m^2/ha] \cdot d [kg_{gleba}/m^3]}$$

$C_{gleba}$  = początkowe stężenie w glebie [mg/kg]; A = stosowana dawka [kg/ha]; 1 = grubość polowej pokrywy glebowej [m]; d = gęstość nasypowa suchej gleby [kg/m<sup>3</sup>]. Według zasady dawka 1 kg/ha powoduje stężenie w glebie 1 mg/kg w 10 cm pokrywie (zakładając, że gęstość nasypowa gleby wynosi 1 g/cm<sup>3</sup>).

podawanych na liście lub do gleby, bez inkorporacji, 2,5 cm jest właściwą głębokością do obliczenia ilości substancji w każdej kolbce. Dla substancji wnikających w glebę właściwą głębokością jest ta podana na etykiecie. Ogólnie dla substancji chemicznych dawka powinna być oszacowana na podstawie najbardziej znaczącego sposobu jej przenikania do gleby; na przykład gdy sposobem dostawania się do gleby są osady ściekowe, to substancja powinna być dawkowana w osadach w stężeniu, które będzie odzwierciedlać spodziewane stężenie w osadzie i ilość osadu dodanego do gleby o zastosowaniu rolniczym. Jeżeli to stężenie nie jest na tyle wysokie, aby pozwolić na określenie głównych produktów przemian, to pomocna może być inkubacja dodatkowych próbek gleby o zwiększonej dawce, ale należy unikać zbyt dużych dawek wpływających na funkcjonowanie mikroorganizmów glebowych (zobacz pkt 1.5 i pkt 1.8.2).

Alternatywnie do większej partii (tj. 1 do 2 kg) gleby można dodawać badaną substancję, którą należy ostrożnie wymieszać we właściwym urządzeniu mieszającym i następnie przenieść w małych porcjach 50 do 200 g do kolbek inkubacyjnych (na przykład za pomocą rozdzielaczy prób). Małe ilości (np. 1 g) z gleby traktowanej w całej partii powinno się analizować na zawartość badanej substancji celem upewnienia się o jej jednorodnym rozproszeniu. Preferuje się taki sposób postępowania, ponieważ pozwala on na bardziej jednorodne rozprowadzenie badanej substancji w glebie.

Próbki gleby bez badanej substancji inkubuje się w takich samych warunkach (tlenowych), jak próbki z badaną substancją. Próbkę tę wykorzystuje się do oznaczeń biomasy pod koniec badania.

Gdy badaną substancję dodaje się do gleby w postaci rozpuszczonej w rozpuszczalnikach organicznych, do próbek gleby dodaje się taką samą ilość rozpuszczalnika i inkubuje w takich samych warunkach (tlenowych), jak próbki z badaną substancją. W celu ustalenia wpływu rozpuszczalnika na biomasę mikroorganizmów próbki te wykorzystuje się do oznaczeń biomasy na początku, podczas i pod koniec badania.

Probówki zawierające glebę z badaną substancją są także dołączane do systemu przepływowego opisanego na rysunku C.23.1 lub zamykane kolumną absorpcyjną przedstawioną na rysunku C.23.2 (zobacz Schemat).

#### 1.9.3. Pobieranie prób i pomiary

Podwójne serie kolb inkubacyjnych usuwa się we właściwych odstępach czasowych, a próbki gleby poddaje się ekstrakcji odpowiednimi rozpuszczalnikami o różnej polarności i analizuje na zawartość badanej substancji i/lub produktów przemian. Dobrze zaprojektowane badanie zapewnia wystarczającą ilość kolb, tak aby używać dwóch kolb w każdym badaniu próbki. Usuwa się także roztwory absorpcyjne lub stałe materiały absorpcyjne w różnych odstępach czasowych (7-dniowe odstępy podczas pierwszego miesią-

ca, następnie w okresie po pierwszym miesiącu w odstępach 17-dniowych) podczas badania i pod koniec okresu inkubacji każdej próbki i analizuje się na zawartość substancji lotnych. Oprócz próbki gleby pobranej bezpośrednio przed podaniem materiału badanego (dzień 0) dołączyć należy przynajmniej pięć próbek pobranych w dodatkowych terminach. Odstępy czasowe należy dobrać w taki sposób, aby można było ustalić model rozpadu badanej substancji i model rozpadu i tworzenia produktów przemiany (np.: dni 0, 1, 3, 7; tygodnie 2, 3; miesiące 1, 2, 3).

Jeżeli stosuje się substancję znakowaną  $^{14}\text{C}$  to radioaktywność, która nie jest ekstrahowalna, będzie określona przez spalanie. Bilans masy oblicza się dla każdego czasu pobierania próbek.

W przypadku inkubacji w warunkach beztlenowych i w przypadku poletka ryżowego fazę glebową i wodną analizuje się na zawartość badanej substancji i produktów przemian razem lub osobno przez filtrację lub odwirowanie przed ekstrakcją i oznaczaniem.

#### 1.9.4. Badania opcjonalne

Przy ustaleniu wpływu temperatury i wilgotności gleby na stopień przemian badanej substancji i/lub jej produktów przemian w glebie pomocne mogą być badania w warunkach tlenowych, niesterylnych w dodatkowych temperaturach i wilgotnościach gleby.

Można dokonać charakterystyki radioaktywnej części, nieulegającej ekstrakcji, np. wykorzystując metodę nadkrytycznej ekstrakcji fluidalnej.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Opracowanie wyników

Ilości badanej substancji, produktów przemian, substancji lotnych (wyrażone tylko w %) i nieulegających ekstrakcji pozostałości powinny być wyrażone jako % stosowanego stężenia początkowego i gdy to właściwe w postaci mg/kg gleby (w przeliczeniu na suchą masę gleby) dla każdego okresu pobierania prób. Bilans masy dla każdego czasu pobierania prób należy przedstawić jako procent stosowanego stężenia początkowego. Graficzne przedstawienie stężeń badanej substancji względem czasu pozwala na oszacowanie jej półokresu przemian lub wartości  $DT_{50}$ . Należy zidentyfikować główne produkty przemian, a ich stężenia powinny być przedstawione na wykresie względem czasu w celu wykazania ich wytworzonych ilości oraz rozpadu. Głównym produktem przemian jest każdy produkt stanowiący  $\geq 10\%$  zastosowanej dawki w jakimkolwiek czasie podczas badania.

Związane produkty lotne dają pewną wiedzę na temat potencjału do lotności badanej substancji i jej produktów przemian z gleby.

Bardziej dokładne oszacowania okresów półokresu lub wartości  $DT_{50}$  i, jeżeli to właściwe, wartości  $DT_{75}$  i  $DT_{90}$  powinno się otrzymać przez zastosowanie odpowiedniego modelu obliczeń kinetycznych. Warto-



ści okresów półrozkładu lub wartości  $DT_{50}$  powinny być przedstawione wraz z opisem zastosowanego modelu, rzędowości kinetyki reakcji i określeniem współczynnika ( $r^2$ ). Preferuje się kinetykę pierwszego rzędu, dopóki  $r^2 < 0,7$ . Gdy to właściwe, to obliczenia należy także przedstawić dla głównych produktów przemian. Przykłady odpowiednich modeli są opisane w pozycjach 31, 32, 33, 34 i 35 piśmiennictwa.

W przypadku badań wykonywanych w różnych temperaturach stopień przemiany powinien być opisany w postaci funkcji temperatury w zakresie temperatur doświadczalnych przy zastosowaniu równania Arrheniusa:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ lub } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

gdzie:

- $\ln A$  i  $B$  są stałymi regresji odpowiednio przecięciem i nachyleniem najdokładniej dopasowanej linii powstałej po liniowej regresji  $\ln k$  względem  $1/T$ ,
- $k$  jest stałą w temperaturze  $T$ ,
- $T$  jest temperaturą wyrażoną w kelwinach.

Należy wziąć pod uwagę wąski zakres temperatur, w którym równanie Arrheniusa jest spełnione, gdy przemiany są powodowane aktywnością mikroorganizmów.

## 2.2. Oszacowanie i interpretacja wyników

Chociaż badania wykonywane są w sztucznym układzie laboratoryjnym, to wyniki pozwalają na oszacowanie stopnia przemian badanej substancji oraz stopnia tworzenia i rozpadu produktów przemian w warunkach polowych (zobacz pozycje 36 i 37 piśmiennictwa).

Badanie szlaków przemian substancji dostarcza informacji o sposobie zmian strukturalnych badanej substancji w glebie na drodze reakcji chemicznych i mikrobiologicznych.

## 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (wskazując pozycję znaczników, gdy stosowano materiał znakowany radioaktywnie) i ważne właściwości fizykochemiczne (zobacz pkt 1.5),
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji,
- czystość radiochemiczna znakowanego związku i specyficzna aktywność (gdy to właściwe).

Substancja kontrolna:

- nazwa chemiczna i struktura substancji kontrolnej stosowanej do opisu i/lub identyfikacji produktu przemiany.

Badane gleby:

- szczegóły dotyczące miejsca pobrania,
- data i sposób pobrania,
- właściwości gleby, takie jak: wartość pH, zawartość węgla organicznego, skład (% piasku, % iłu, % gliny), zdolność wymiany jonów, gęstość ogólna, retencja wody, biomasa mikroorganizmów,
- długość okresu przechowywania i warunki przechowywania (jeżeli była przechowywana).

Warunki badania:

- daty wykonania badania,
- ilość dodanej badanej substancji,
- stosowane rozpuszczalniki i metoda zaaplikowania badanej substancji,
- masa gleby traktowanej na początku badania i pobieranej w każdym interwale czasowym,
- opis stosowanego systemu inkubacyjnego,
- ilości przepływającego powietrza (tylko dla systemów przepływowych),
- temperatura w czasie doświadczenia,
- wilgotność gleby podczas inkubacji,
- początkowa biomasa mikroorganizmów, następnie podczas badania i na koniec w warunkach tlenowych,
- wartość pH, stężenie tlenu i potencjał red-oks na początku badania, podczas i na koniec badania w warunkach beztlenowych i poletka ryżowego,
- metody ekstrakcji,
- metody oznaczania ilościowego i identyfikacji badanej substancji i głównych produktów przemian w glebie i materiałach absorpcyjnych,
- liczba powtórzeń i liczba kontroli.

Wyniki:

- wyniki oznaczenia aktywności mikrobiologicznej,
- powtarzalność i czułość stosowanych metod analitycznych,
- stopień odzysku (wartości % dla zwalidowanego badania podano w pkt 1.7.1),
- tabelaryzowane wyniki wyrażone jako % stosowanej początkowej dawki  $i$ , gdy to właściwe, jako mg/kg gleby (na podstawie suchej masy),



- bilans masy podczas i na koniec badania,
- opis nieekstrahowalnej (związanej) radioaktywności lub pozostałości w glebie,
- ilościowe oznaczenie uwolnionego CO<sub>2</sub> i innych lotnych związków,
- wykresy stężeń glebowych względem czasu dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla głównych produktów przemian,
- okres półrozkładu lub DT<sub>50</sub>, DT<sub>75</sub> i DT<sub>90</sub> dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla głównych produktów przemian wraz z przedziałami ufności,
- oszacowanie stopnia degradacji abiotycznej w warunkach sterylnych,
- oszacowanie kinetyki przemian dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla głównych produktów przemian,
- proponowane szlaki przemian, gdy to właściwe,
- dyskusja i interpretacja wyników,
- dane pierwotne (tj. wybrane chromatogramy, wybrane obliczenia stopnia przemian i sposoby identyfikacji produktów przemian).

#### 4. PIŚMIENNICTWO

- 1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4—1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden-Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- 6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality-Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions. PN-ISO 11266:1997 Jakość gleby — Zasady prowadzenia badań laboratoryjnych nad biodegradacją związków organicznych w glebie w warunkach tlenowych.
- 7) ISO 14239 (1997). Soil Quality-Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. PN-ISO 14239:2000 Jakość gleby — Laboratoryjne metody inkubacji do pomiaru mineralizacji związków organicznych w glebie w warunkach tlenowych.
- 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 — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- 10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18—20 January 1995.
- 11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123—157.
- 12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).
- 13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945—956 (IUPAC 1984).
- 14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- 15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. PN-ISO 10381-6:1998 Jakość gleby — Pobieranie próbek — Zasady dotyczące pobierania, postępowania z próbkami i przechowywania próbek gleby przeznaczonych do badania tlenowych (aerobowych) procesów mikrobiologicznych w warunkach laboratoryjnych.
- 16) Annex V to Dir. 67/548/EEC.
- 17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85—114.
- 18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- 19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- 20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- 21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

- 22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- 23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- 24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215—221.
- 25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method. PN-ISO 14240-1:2001 Jakość gleby — Oznaczenie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda indukcji oddychania przez dodanie substratu. PN-ISO 14240-2:2001 Jakość gleby — Oznaczenie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda fumigacji — ekstrakcji.
- 26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45—60.
- 27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16<sup>th</sup> Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105—120.
- 28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59—63 (SETAC-Europe).
- 29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68—69 (SETAC-Europe).
- 30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197—200.
- 31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141—146.
- 32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides*, 181—199.
- 33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „*Environmental Dynamics of Pesticides*”. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135—172.
- 34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. *Pflanzenschutz—Nachrichten Bayer* 39, 188—204.
- 35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. *Pflanzenschutz—Nachrichten Bayer* 33, 47—60.
- 36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. *Environm. Sci. Technol.* 24, 1032—1041.
- 37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In *Interactions between Herbicides and the Soil* (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83—122.

TABELA C.23.1

PRĘŻNOŚĆ WODY, POJEMNOŚĆ POLOWA (FC) I CAŁKOWITA POJEMNOŚĆ WODNA (WHC)<sup>1)</sup>

Wysokość słupa wody [cm]	pF <sup>(a)</sup>	bar <sup>(b)</sup>	Uwagi
10 <sup>7</sup>	7	10 <sup>4</sup>	Sucha gleba
1,6 · 10 <sup>4</sup>	4,2	16	Punkt wędnięcia
10 <sup>4</sup>	4	10	
10 <sup>3</sup>	3	1	
6 × 10 <sup>2</sup>	2,8	0,6	
3,3 × 10 <sup>2</sup>	2,5	0,33 <sup>(c)</sup>	} Zakres pojemności polowej <sup>(d)</sup>
10 <sup>2</sup>	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (przybliżenie)
1	0	0,001	Gleba nasycona wodą

(a) pF = log cm słupa wody.

(b) 1 bar = 10<sup>5</sup> Pa.

(c) Odpowiada przybliżonej 10 % zawartości wody w piasku, 35 % w ile i 45 % w glinie.

(d) Pojemność polowa nie jest stała, ale waha się w zależności od rodzaju gleby pomiędzy pF 1,5 i 2,5.

*Ciśnienie ssania gleby* jest mierzone w cm słupa wody lub w barach. Ze względu na duży zakres prężności jest wyrażane jako pF, które jest ekwiwalentem logarytmu cm słupa wody.

*Pojemność polowa* jest definiowana jako ilość wody, która może być zatrzymana względem grawitacji przez naturalną glebę 2 dni pod dłuższym okresie opadów lub odpowiednim nawodnieniu. Określana jest w glebie niewzruszonej *in situ* w warunkach polowych. Pomiaru nie można więc zastosować dla gleb laboratoryjnych. Wartości FC oznaczone w glebach wzruszonych mogą charakteryzować się wielką zmiennością.

*Pojemność wodna* jest określana w laboratorium we wzruszonej i niewzruszonej glebie przez nasycenie kolumny gleby wodą przez transport kapilarny. Jest szczególnie użyteczna dla gleb wzruszonych i może być do 30 % większa od pojemności polowej (zobacz pozycja 1 piśmiennictwa). Jest także doświadczalnie łatwiejsza do określenia niż wiarygodne wartości FC.

<sup>1)</sup> Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

TABELA C.23.2:

ZAWARTOŚĆ WILGOTNOŚCI (g wody na 100 g suchej gleby)  
RÓŻNYCH RODZAJÓW GLEBY Z RÓŻNYCH KRAJÓW

Rodzaj gleby	Kraj	Zawartość wilgotności gleby w		
		WHC <sup>1)</sup>	pF = 1,8	pF = 2
Piaszczysta	Niemcy	28,7	8,8	3
Ilasto-piaszczysta	Niemcy	50,4	17,9	12
Ilasto-piaszczysta	Szwajcaria	44,0	35,3	9
Pyl ilasty	Szwajcaria	72,8	56,6	28
Gliniasto-ilasta	Brazylia	69,7	38,4	27
Gliniasto-ilasta	Japonia	74,4	57,8	31
Piaszczysto-ilasta	Japonia	82,4	59,2	36
Pyl ilasty	USA	47,2	33,2	18
Piaszczysto-ilasta	USA	40,4	25,2	13

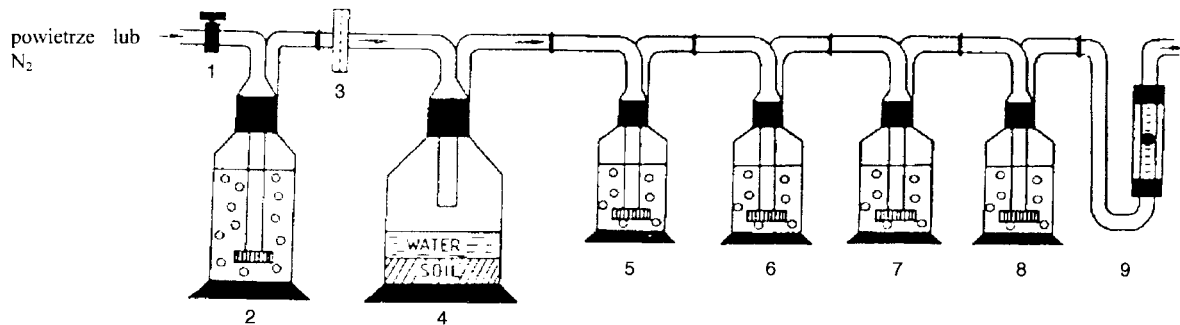
<sup>1)</sup> Całkowita pojemność wodna.

## Schemat:

Rysunek C.23.1

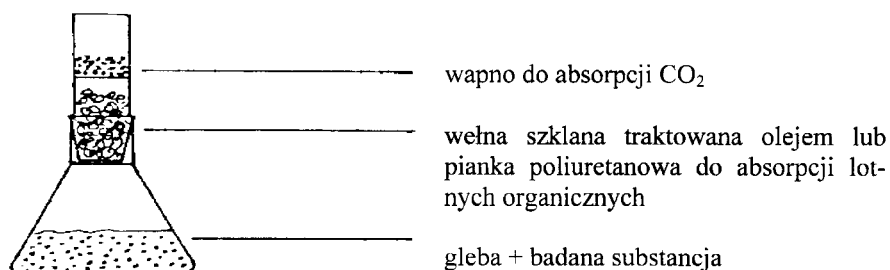
Przykład układu przepływowego do badania przemian substancji chemicznych w glebie  
(zobacz pozycje 1 i 2 piśmiennictwa)

- 1: zawór iglicowy
- 2: butla przemywająca gaz zawierająca wodę
- 3: ultra membrana (tylko w warunkach połowych), rozmiar oczka 0,2  $\mu\text{m}$
- 4: kolba metabolizmu gleby (zalewana wodą tylko w warunkach beztlenowych I poletka ryżowego)
- 5: pułapka z glikolem etylenowym dla lotnych związków organicznych
- 6: pułapka z kwasem siarkowym dla zasadowych związków lotnych
- 7, 8: pułapka z wodorotlenkiem sodu dla  $\text{CO}_2$  & inne kwasowe lotne
- 9: pomiar przepływu



Rysunek C.23.2

Przykład kolb biometrycznych do badania przemian substancji chemicznych w glebie  
(zobacz pozycja 3 piśmiennictwa)



- 1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123—157.
- 2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85—114.
- 3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141—146.

## C.24. PRZEMIANY TLENOWE I BEZTLENOWE W OSADACH WODNYCH

### 1. METODA

Niniejsza metoda jest równoważna metodzie opisanej w Wytycznej OECD nr 308 (2002).

#### 1.1. Wstęp

Substancje chemiczne mogą wnikać do płytkich lub głębokich wód powierzchniowych bezpośrednio, przez spływy, kanalizacje, ze ściekami przemysłowymi, komunalnymi lub rolniczymi i opadami atmosferycznymi. Niniejsza metoda badawcza opisuje sposób oszacowania tlenowych i beztlenowych przemian związków chemicznych w osadach wodnych. Metoda ta opiera się na istniejących Wytycznych (zobacz pozycje 1, 2, 3, 4, 5 i 6 piśmiennictwa). Na Warsztatach OECD dotyczących wyboru gleb i osadów, które odbywały się we Włoszech, Belgirate w 1995 r. (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa), uzgodniono liczbę i rodzaje osadów do stosowania w niniejszym badaniu. Na Warsztatach podjęto także zalecenia w zakresie pobierania, obróbki i przechowywania próbek osadów w oparciu o Wytyczne ISO (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Takie badania są wymagane dla substancji, które są stosowane bezpośrednio na wodę lub najprawdopodobniej dostaną się do środowiska wodnego opisanymi powyżej szlakami.

Warunki panujące w naturalnych systemach osadów wodnych są często tlenowe w górnej warstwie wodnej. Górna powłoka osadu może być zarówno tlenowa, jak i beztlenowa, podczas gdy głębsze warstwy są zazwyczaj beztlenowe. Dlatego w niniejszym badaniu ujęto metodykę zarówno dla warunków tlenowych, jak i beztlenowych. Badanie w warunkach tlenowych symuluje kolumnę wodną nasyconą tlenem nad tlenową powłoką osadu z beztlenowym podłożem. Badanie symuluje całkowicie beztlenowy układ woda-osad. Jeżeli okoliczności wskazują na konieczność zmiany powyższych zaleceń na przykład przez zastosowanie nie naruszonych osadów lub osadów, które były narażone na badaną substancję, to dla takich celów dostępne są inne metody (zobacz pozycja 9 piśmiennictwa).

#### 1.2. Definicje

Należy stosować jednostki Międzynarodowego Systemu (SI).

**Badana substancja:** każda substancja, w tym związek wyjściowy i odpowiednie produkty przemian.

**Produkty przemian:** wszystkie substancje pochodzące z reakcji przemian biotycznych lub abiotycznych badanej substancji, w tym  $\text{CO}_2$  i związane pozostałości.

**Związane pozostałości:** „Związane pozostałości” stanowią związki w glebie, roślinie lub zwierzęciu, które trwają w matrycy w postaci związku wyjściowego lub jego metabolitów/produktów przemian po ekstrakcji.

Metoda ekstrakcji nie powinna znacząco zmieniać samych związków lub struktury matrycy. Sposób wiązania może być częściowo wyjaśniony przez zmianę sposobu ekstrakcji z matrycy lub wyspecjalizowane techniki analityczne. W taki sposób zidentyfikowane na przykład wiązania kowalencyjno-jonowe i sorpcyjne, a także „pułapki”. Ogólnie tworzenie związanych pozostałości redukuje znacząco biodostępność i bioprzystępność (zobacz pozycja 10 piśmiennictwa) [zmodyfikowane według IUPAC 1984 (zobacz pozycja 11 piśmiennictwa)].

**Przemiany tlenowe:** (utleniające) reakcje zachodzące w obecności tlenu cząsteczkowego (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa).

**Przemiany beztlenowe:** (redukujące) reakcje zachodzące pod nieobecność tlenu cząsteczkowego (zobacz pozycja 12 piśmiennictwa).

**Wody naturalne:** wody powierzchniowe pochodzące ze stawów, rzek, strumieni itp.

**Osad:** jest mieszaniną mineralnych i organicznych składników chemicznych, przy czym te drugie składają się ze związków o wysokiej zawartości węgla i azotu i o wysokich masach cząsteczkowych. Tworzy się w wodach naturalnych i ma powierzchnię kontaktową z wodą.

**Mineralizacja:** jest pełnym rozkładem związku organicznego do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  w warunkach tlenowych oraz  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  w warunkach beztlenowych. W kontekście niniejszej metody, gdy stosuje się związek znakowany, mineralizacja oznacza rozkład, podczas którego znakowany atom węgla jest utleniany lub redukowany ilościowo z uwolnieniem odpowiedniej ilości  $^{14}\text{CO}_2$  lub  $^{14}\text{CH}_4$ .

**Okres półrozkładu:**  $t_{0,5}$  jest czasem potrzebnym na 50 % przemian badanej substancji, jeżeli przemiany można opisać kinetyką pierwszego rzędu; nie zależy od stężenia początkowego.

**DT<sub>50</sub> (Okres Zanikania 50):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 50 %.

**DT<sub>75</sub> (Okres Zanikania 75):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 75 %.

**DT<sub>90</sub> (Okres Zanikania 90):** jest czasem, w którym stężenie badanej substancji jest zredukowane o 90 %.

#### 1.3. Substancje kontrolne

Substancje kontrolne powinny być stosowane celem charakteryzacji i/lub identyfikacji produktów przemian metodami spektroskopowymi lub chromatograficznymi.

#### 1.4. Informacje o badanej substancji

Dla pomiaru stopnia przemian stosować można substancje znakowane i nieznakowane, chociaż prefe-

ruje się materiał znakowany. Materiał znakowany jest wymagany do badania szlaków przemian i ustalania bilansu masy. Zalecane jest znakowanie  $^{14}\text{C}$ , ale zastosowanie innych izotopów, takich jak  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ , także może być użyteczne. Na tyle, na ile to możliwe, znacznik powinien być umiejscowiony w najbardziej stabilnej części cząsteczki<sup>18</sup>. Czystość badanej substancji i/lub czystość radiochemiczna powinny wynosić przynajmniej 95 %.

Przed wykonaniem badania na temat badanej substancji dostępne powinny być następujące informacje:

- a) rozpuszczalność w wodzie (metoda A.6),
- b) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych,
- c) prężność par (metoda A.4) i stała Henry'ego,
- d) współczynnik podziału n-oktanol/woda (metoda A.8),
- e) współczynnik adsorpcji ( $K_d$ ,  $K_f$  lub  $K_{OC}$ ) (metoda C.18),
- f) hydroliza (metoda C.7.),
- g) stała dysocjacji ( $\text{p}K_a$ ) [Wytyczna OECD nr 112], zobacz pozycja 13 piśmiennictwa,
- h) struktura chemiczna badanej substancji i umiejscowienie znacznika, jeżeli był stosowany.

*Uwaga:* należy podać temperaturę, w jakiej oznaczano powyższe wartości.

Inne użyteczne informacje to dane o toksyczności badanej substancji dla mikroorganizmów glebowych, dane na temat biodegradacji i dane o przemianach tlenowych i beztlenowych w glebie.

Dostępne powinny być metody analityczne (w tym metody ekstrakcji i oczyszczania) dla ilościowego oznaczania i identyfikacji badanej substancji i jej produktów przemian.

### 1.5. Zasada metody badawczej

Metoda tutaj opisana opiera się na tlenowym i beztlenowym systemie osadu wodnego (zobacz Wytyczne do beztlenowych i tlenowych układów badawczych), który pozwala na:

- (i) pomiar stopnia przemian badanej substancji w układzie woda-osad,
- (ii) pomiar stopnia przemian badanej substancji w osadzie,

(iii) pomiar stopnia mineralizacji badanej substancji i/lub jej produktów przemian (gdy stosowana jest substancja znakowana  $^{14}\text{C}$ ),

(iv) identyfikację i ilościowe oznaczenie produktów przemian w fazie wodnej i osadzie wraz z bilansem wagowym (gdy stosowana jest znakowana badana substancja),

(v) pomiar rozproszenia badanej substancji i jej produktów przemian pomiędzy dwie fazy podczas okresu inkubacji w ciemności (na przykład w celu uniknięcia zakwitu glonów) w stałej temperaturze. Wartości okresu półrozpadu  $\text{DT}_{50}$ ,  $\text{DT}_{75}$  i  $\text{DT}_{90}$  są wyznaczane, gdy pozwalają na to dane, ale nie powinny być ekstrapolowane zbyt daleko poza czas trwania badania (zobacz pkt 1.2).

Wymagane są przynajmniej dwa osady i związane z nimi fazy wodne zarówno do badań tlenowych, jak i beztlenowych (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Jednak mogą zaistnieć przypadki, w których trzeba będzie zastosować więcej niż dwa osady wodne, na przykład dla substancji obecnych w środowiskach słonowodnych i/lub wodach słodkich.

### 1.6. Zastosowanie badania

Metodę można stosować ogólnie dla substancji chemicznych (znakowanych lub nie), dla których dostępna jest metoda analityczna o odpowiedniej dokładności i czułości. Badanie stosuje się dla związków o niewielkiej lotności, nielotnych, rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie. Badania nie należy wykonywać dla substancji o wysokiej lotności z wody (np. fumiganty, rozpuszczalniki organiczne), których nie można utrzymać w wodzie i/lub osadzie w warunkach doświadczalnych badania.

Dotychczas metodę stosowano do badania przemian substancji chemicznych w wodach słodkich i osadach, ale ogólnie można ją także stosować w układach morskich i stref przejściowych. Metoda nie jest odpowiednia do badań w warunkach symulacji wód płynących (np. rzeki) lub morza.

### 1.7. Kryteria jakości

#### 1.7.1. Odzysk

Ekstrakcja i analiza przynajmniej podwójnych próbek wody i osadu tuż po dodaniu badanej substancji daje pierwsze wskazówki co do powtarzalności metody analitycznej i jednorodności zaaplikowania badanej substancji. Odzyski dla dalszych faz badania można ustalić przez odpowiednie bilansy wagowe. Odzysk powinien mieścić się w granicach 90 % do 110 % dla substancji znakowanych (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa) i 70 % do 110 % dla substancji nieznakowanych.

#### 1.7.2. Powtarzalność i czułość metody analitycznej

Powtarzalność metody analitycznej (z wyłączeniem wydajności początkowej ekstrakcji) w ilościowym oznaczaniu substancji i produktów przemian można sprawdzić przez podwójną analizę tego samego ekstraktu wody lub osadu inkubowanego na tyle długo, by powstały produkty przemiany.

<sup>18</sup> Na przykład, jeżeli badana substancja zawiera jeden pierścień, wymagane jest znakowanie w tym pierścieniu; jeżeli badana substancja zawiera dwa lub więcej pierścieni, to konieczne mogą okazać się dodatkowe badania celem określenia losu każdego znakowanego pierścienia, by uzyskać odpowiednie informacje o tworzeniu produktów przemian.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej badanej substancji i produktów przemiany powinna wynosić przynajmniej 0,01 mg/kg wody lub osadu (jako badana substancja) lub 1 % zastosowanej dawki, w zależności która z wartości jest niższa. Granica oznaczalności (LOQ) powinna być także określona.

### 1.7.3. Dokładność danych przemian

Analiza regresji stężeń badanej substancji jako funkcji czasu daje właściwą informację o wiarygodności krzywej przemian i pozwala na obliczenie przedziałów ufności dla okresów półrozpadu (w przypadku kinetyki pseudopierwszego rzędu) lub wartości  $DT_{50}$  i, jeżeli to właściwe, także wartości  $DT_{75}$  i  $DT_{90}$ .

## 1.8. Opis metody badawczej

### 1.8.1. System badawczy i sprzęt

Badanie powinno być wykonane w naczyniach szklanych (np. butlach, probówkach wirówkowych), chyba że wcześniej uzyskane informacje (takie jak współczynnik podziału oktanol-woda, dane sorpcyjne itp.) wskazują, że badana substancja może adsorbować się na szkło. W takim przypadku stosować należy naczynia z innego materiału (np. z teflonu). Gdy wiadomo, że badana substancja przywiera do szkła, problem ten można rozwiązać według następujących metod:

- określić masę badanej substancji i produktów przemian sorbowanych na szkło,
- na koniec badania obmyć szkło rozpuszczalnikiem,
- stosować produkty w postaci formulacji (zobacz pkt 1.9.2),
- zastosować zwiększoną ilość wstępnie rozpuszczalnika przy dodaniu badanej substancji do układu; jeżeli taki rozpuszczalnik jest stosowany, to nie powinien on doprowadzać do rozpadu badanej substancji.

Przykłady typowych systemów badawczych, tj. przepływowych i biometrycznych, przedstawiono odpowiednio na rysunkach C.24.1 i C.24.2 (zobacz pozycja 14 piśmiennictwa). Inne systemy inkubacyjne opisano w pozycji 15 piśmiennictwa. System badawczy powinien umożliwiać wymianę powietrza lub azotu oraz wyłapywanie produktów lotnych. Wymiary układu powinny być takie, by spełnione były wszystkie wymagania badania (zobacz pkt 1.9.1). Wentylacja może następować albo przez łagodnie bąbelkowanie lub przepuszczanie powietrza lub azotu nad powierzchnią wody. W tym drugim przypadku łagodnie mieszanie wody od góry jest doradzane dla lepszego rozprowadzenia tlenu lub azotu w wodzie. Powietrze wolne od  $CO_2$  nie powinno być stosowane, ponieważ powoduje to wzrost wartości pH wody. W każdym z tych przypadków wzbudzanie osadu jest niepożądane i należy tego unikać na tyle, na ile to tylko możliwe. Substancje w niewielkim stopniu lotne należy badać w systemie kolb biometrycznych, łagodnie mieszając powierzchnią wody. Stosowane mogą być także naczynia zamknięte z przestrzenią wypełnioną powietrzem lub azotem z probówkami w środku dla wyłapy-

wania produktów lotnych (zobacz pozycja 16 piśmiennictwa). W badaniu w warunkach tlenowych wymagana jest regularna wymiana powietrza celem kompensacji zużycia tlenu przez biomasę.

Odpowiednie pułapki do wyłapywania produktów lotnych to między innymi dla dwutlenku węgla<sup>19</sup> to 1 mol/dm<sup>3</sup> roztwory wodorotlenku potasu lub wodorotlenku sodu i glikol etylenowy, etanoloamina lub 2 % parafina w ksylenie dla związków organicznych. Substancje lotne powstające w warunkach beztlenowych, takie jak metan, mogą być wychwytywane na przykład na sitach molekularnych. Takie substancje mogą być na przykład spalane do  $CO_2$  przez przepuszczanie gazu przez szklaną rurkę z  $CuO$  w temperaturze 900 °C i wyłapywanie  $CO_2$  tworzonego w absorberze z zasadami (zobacz pozycja 17 piśmiennictwa).

Do analizy chemicznej badanej substancji i produktów przemian wymagany jest odpowiedni sprzęt laboratoryjny (np. sprzęt do: chromatografii gazowej (GLC), chromatografii cieczowej (HPLC), chromatografii cienkowarstwowej (TLC), spektroskopii masowej (MS), chromatografii gazowej sprzężonej ze spektroskopią masową (GC-MS), chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią masową (LC-MS), jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) itp.) wraz z systemami detekcji substancji znakowanych i nieznakowanych. Gdy stosowany jest materiał znakowany radioaktywnie, wymagany będzie także licznik scyntylacyjny i utleniacz (dla spalania próbek osadu przed analizą radioaktywności).

Inny standardowy sprzęt laboratoryjny, szkło, odczynniki i substancje chemiczne wymagane są według potrzeb do oznaczeń fizykochemicznych i biologicznych (zobacz pkt 1.8.2.2, tabela C.24.1).

### 1.8.2. Wybór i liczba osadów wodnych

Miejsca pobierania powinny być wybrane pod kątem celu badania. Przy wyborze miejsca pobierania pod uwagę należy brać możliwe zanieczyszczenia rolnicze, przemysłowe lub komunalne wnikaające do wód. Osady nie powinny być stosowane, jeżeli były zanieczyszczone badaną substancją lub jej strukturalnymi analogami w ciągu ostatnich czterech lat.

#### 1.8.2.1. Wybór osadu

W badaniach tlenowych stosuje się dwa rodzaje osadu (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Powinny się one różnić pod względem zawartości węgla organicznego i składu. Jeden z osadów powinien charakteryzować się wysoką zawartością węgla organicznego (2,5—7,5 %) i drobnoziarnistą strukturą, natomiast drugi powinien charakteryzować się niską zawartością węgla organicznego (0,5—2,5 %) i strukturą gruboziarnistą. Różnica w zawartości węgla organicznego powinna wynosić przynajmniej 2 %. Struktura „drob-

<sup>19</sup> Ze względu na to, że te zasadowe roztwory sorpcyjne wiążą także dwutlenek węgla z powietrza przechodzącego przez układ i ten wytworzony w wyniku respiracji w doświadczeniach tlenowych, to muszą one być wymieniane w regularnych odstępach, by uniknąć ich nasycenia i straty ich zdolności absorpcyjnych.

noziarnista” jest zdefiniowana jako zawartość [glina + it]<sup>20</sup> >50 %, a struktura „gruboziarnista” jako zawartość [glina + it] <50 %. Różnica w zawartości [glina + it] powinna wynosić przynajmniej 20 %. W przypadku gdy substancja chemiczna może także dostać się do środowiska morskiego, przynajmniej jeden z badanych osadów powinien być pochodzenia morskiego.

W przypadku badań ściśle beztlenowych dwa osady (wraz z towarzyszącymi im wodami) należy pobrać ze strefy beztlenowej wód powierzchniowych (zobacz pozycja 7 piśmiennictwa). Zarówno osad, jak i faza wodna powinny być transportowane bez dostępu tlenu.

Przy wyborze osadu ważne mogą być także inne parametry i powinny być one brane pod uwagę indywidualnie dla każdego przypadku. Na przykład zakres wartości pH osadu powinien być ważny w badaniu substancji, których przemiany i/lub sorpcja mogą być zależne od wartości pH. Zależność sorpcji od wartości pH może odzwierciedlać się w wartości pK<sub>a</sub> badanej substancji.

### 1.8.2.2. Opis próbek osad-woda

Kluczowe parametry, które muszą być oznaczane i przedstawiane w sprawozdaniu (z podaniem stosowanej metody) zarówno dla osadu, jak i wody, oraz faza badania, w której te parametry mają być oznaczane, przedstawiono w tabeli C.24.1. Metody oznaczania tych parametrów podano w pozycjach 18, 19, 20 i 21 piśmiennictwa.

Ponadto inne parametry mogą być konieczne do oznaczania w konkretnych przypadkach (np. dla wód słodkich: zawiesina, zasadowość, twardość, przewodnictwo, NO<sub>3</sub>/PO<sub>4</sub> (stosunek i wartości indywidualne); dla osadów: zdolność wymiany jonów, całkowita pojemność wodna, węglany, fosfor i azot całkowity; dla systemów morskich: zasolenie). Analiza osadów i wody pod względem zawartości azotanów, siarczanów biodostępnego żelaza i innych biocząstek elektronów może być także użyteczna w szacowaniu warunków red-oks szczególnie w odniesieniu do przemian beztlenowych.

TABELA C.24.1:

Pomiar parametrów charakteryzujących próbki woda-osad (zobacz pozycje 7, 22 i 23 piśmiennictwa)

Parametr	Faza badania					
	pobieranie próby	obróbka	początek aklimatyzacji	początek badania	badanie	koniec badania
<b>Woda</b>						
Pochodzenie/źródło	x					
Temperatura	x					
Wartość pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Stężenie* O <sub>2</sub>	x		x	x	x	x
Potencjał red-oks*			x	x	x	x
<b>Osad</b>						
Pochodzenie/źródło	x					
Głębokość powłoki	x					
Wartość pH		x	x	x	x	x
Rozkład rozmiarów cząstek		x				
TOC		x	x	x		x
Biomasa mikroorganizmów**		x		x		x
Potencjał red-oks *	Obserwacja (kolor/zapach)		x	x	x	x

\* Wyniki najnowszych badań wykazały, że pomiary stężenia tlenu w wodzie i potencjału red-oks nie mają wartości mechanicznej ani przewidującej, jeżeli rozpatrywany jest wzrost i rozwój populacji mikroorganizmów w wodach powierzchniowych (zobacz pozycje 24 i 25 piśmiennictwa). Lepszymi narzędziami do interpretacji i oszacowania szlaków i stopnia przemian tlenowych jest oznaczenie biologicznego zapotrzebowania na tlen (BZT w miejscu pobierania, na początku i na końcu badania) i stężenie mikro/makro-elementów Ca, Mg i Mn (na początku i na końcu badania) w wodzie oraz całkowitego N i całkowitego P w osadzie (w miejscu pobierania i na końcu badania).

\*\* Metoda stopnia oddychania mikroorganizmów (zobacz pozycja 26 piśmiennictwa), metoda fumigacji (zobacz pozycja 27 piśmiennictwa) lub płytkowy pomiar ilości (np. bakterie, grzyby i kolonie) dla badań tlenowych; stopień metanogenezy dla badań beztlenowych.

<sup>20</sup> [Glina + it] jest mineralną frakcją osadu o rozmiarach cząstek < 50 μm.



### 1.8.3. Pobieranie, obróbka i przechowywanie

#### 1.8.3.1. *Pobieranie*

Przy pobieraniu osadów kierować należy się dokumentem przewodnim ISO na temat pobierania osadów dennych (zobacz pozycja 8 piśmiennictwa). Próbkę osadu należy pobierać z całej warstwy 5 do 10 cm wgłęb osadu. Związana woda powinna być pobierana z tego samego miejsca i w tym samym czasie co osad. W przypadku badań beztlenowych osad i związana z nim woda powinny być pobierane i transportowane pod nieobecność tlenu (zobacz pozycja 28 piśmiennictwa (zobacz pkt 1.8.2.1). Niektóre urządzenia do pobierania prób opisano w pozycji 8 i 23 piśmiennictwa).

#### 1.8.3.2. *Opracowanie*

Osad jest oddzielany od wody przez filtrację, a osad przesiewany na mokro przez sito o oczkach 2 mm jest odrzucany. Znane ilości wody i osadu miesza się w pożądanym stosunku (zobacz pkt 1.9.1) w kolbach inkubacyjnych i przygotowuje do okresu aklimatyzacji (zobacz pkt 1.8.4). W przypadku badań beztlenowych wszystkie czynności należy wykonać bez dostępu do tlenu (zobacz pozycje 29, 30, 31, 32 i 33 piśmiennictwa).

#### 1.8.3.3. *Przechowywanie*

Zaleca się stosowanie świeżo pobranych osadów, ale jeżeli przechowywanie jest konieczne, to osad i woda powinny być przesiane, jak opisano powyżej, i przechowywane zalane wodą (warstwa wody 6–10 cm) w ciemności w  $4 \pm 2$  °C<sup>21</sup> przez maksimum 4 tygodnie (zobacz pozycje 7, 8 i 23 piśmiennictwa). Próbki, które będą stosowane w badaniach tlenowych, należy przechowywać przy swobodnym dostępie powietrza (np. otwarte pojemniki), podczas gdy próbki przeznaczone do badań beztlenowych bez dostępu tlenu. Podczas transportu i przechowywania nie powinno dojść do zamrażania osadu i wody oraz wysuszania osadu.

#### 1.8.4. Przygotowanie próbek osadu/wody do badania

Przed dodaniem badanej substancji powinien mieć miejsce okres aklimatyzacji, podczas którego każda próbka wody/osadu jest umieszczana w naczyniu inkubacyjnym stosowanym później w badaniu, a aklimatyzacja powinna być przeprowadzana w takich samych warunkach jak inkubacja w badaniu (zobacz pkt 1.9.1). Okres aklimatyzacji jest czasem potrzebnym do osiągnięcia stabilności układu, co odzwierciedla się w wartości pH, stężeniu tlenu w wodzie i potencjale red-oks w wodzie i osadzie oraz makroskopowym rozdzieleniu faz. Okres aklimatyzacji powinien trwać pomiędzy jednym a dwoma tygodniami, a nie powinien przekraczać czterech tygodni. Należy przedstawić wyniki pomiarów i oznaczeń dokonanych podczas tego okresu.

<sup>21</sup> Najnowsze badania wykazały, że przechowywanie w 4 °C może doprowadzić do spadku zawartości węgla organicznego w osadzie i przez to być może do spadku aktywności mikroorganizmów 34).

### 1.9. Wykonanie badania

#### 1.9.1. Warunki badania

Badanie należy wykonać w urządzeniu inkubacyjnym (zobacz pkt 1.8.1) ze stosunkiem objętościowym woda-osad pomiędzy 3:1 a 4:1 oraz powłoką osadu  $2,5 \pm 0,5$  cm<sup>1</sup>. Jako minimalną ilość osadu zaleca się 50 g (w przeliczeniu na suchą masę) w każdym naczyniu.

Badanie należy wykonać w ciemności w stałej temperaturze w zakresie 10 do 30 °C. Temperatura  $20 \pm 2$  °C jest właściwa. Jeżeli to konieczne, to dla każdego indywidualnego przypadku można rozpatrywać badanie w niższej temperaturze (np. 10 °C) w zależności od tego, jaki jest cel badania. Temperatura inkubacji powinna być monitorowana i przedstawiona w sprawozdaniu.

#### 1.9.2. Podawanie badanej substancji

Stosuje się jedno stężenie badanej substancji<sup>22</sup>. W przypadku środków ochrony roślin stosowanych bezpośrednio na powierzchnię wody maksymalna zalecana dawka powinna być zastosowana jako dawka w badaniu obliczona w oparciu o powierzchnię wody w naczyniu doświadczalnym. W innych przypadkach stężenie, które ma być badane, powinno opierać się na przewidywanych emisjach środowiskowych. Należy podjąć wszelkie starania, aby właściwie wyznaczyć badane stężenie oraz aby opisać szlak przemian i tworzenie i rozpad produktów przemian. Konieczne może być stosowanie wyższych dawek (np. 10 razy) w sytuacjach, gdzie stężenia badanej substancji są bliskie ich granicom oznaczalności na początku badania i/lub gdy główne produkty przemian nie mogą być łatwo wykryte, jeżeli są obecne w 10 % stosowanej dawki badanej substancji. Jeżeli stosowane są jednak stężenia wyższe, to nie powinny one mieć szkodliwych wpływów na aktywność mikroorganizmów układu woda-osad. W celu osiągnięcia stałego stężenia badanej substancji w naczyniach o różnych wymiarach, konieczne może być wzięcie pod uwagę dostosowania ilości stosowanego materiału w oparciu o głębokość kolumny wody w naczyniu w odniesieniu do głębokości wody w warunkach polowych (która, zakłada się, że wynosi 100 cm, ale inne głębokości mogą być stosowane). Zobacz Przykład obliczeń dawki do naczyń doświadczalnych zawierający przykładowe przeliczenia.

Najlepiej badaną substancję stosować jako roztwór wodny do fazy wodnej układu badawczego. Jeżeli nie da się tego uniknąć, można stosować małe ilości rozpuszczalników mieszających się z wodą (takie jak aceton, etanol) celem wprowadzenia i rozproszenia badanej substancji, ale nie powinny one przekraczać 1 % v/v i nie powinny mieć szkodliwego wpływu

<sup>22</sup> Badanie z drugim stężeniem może być użyteczne dla substancji, które wnikają do wód powierzchniowych różnymi szlakami, wpływając na tworzenie się różnych stężeń tak długo, jak niższe stężenie może być oznaczone analitycznie z odpowiednią dokładnością.

na aktywność mikroorganizmów układu badawczego. Należy podjąć wszelkie starania, aby właściwie przygotować roztwory wodne badanej substancji — właściwe może być stosowanie wcześniejszego mieszanina i kolumn nasycających dla zapewnienia odpowiedniej jednorodności. Po dodaniu roztworu wodnego do układu badawczego zalecane jest łagodne mieszanie fazy wodnej, wzburzając osad jak najmniej to możliwe.

Stosowanie gotowych formulacji nie jest zalecane do rutynowych badań, ponieważ składniki formulacji mogą wpływać na rozmieszczenie badanej substancji i/lub produktów przemian pomiędzy fazą wodną i osadem. Jednak w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie zastosowanie gotowej formulacji może być właściwą alternatywą.

Liczba naczyń inkubacyjnych zależy od tego, ile razy pobiera się próbki (zobacz pkt 1.9.3). Na doświadczenie powinna składać się wystarczająca liczba naczyń, tak aby w każdym czasie poboru próbek można było poświadczyć dwa naczynia. Jednostki kontrolne każdego układu osadu wodnego nie powinny być narażane na badaną substancję. Jednostki kontrolne mogą być wykorzystywane do określania biomasy mikroorganizmów osadu oraz całkowitego węgla organicznego wody i osadu na zakończenie badania. Dwie jednostki kontrolne (tj. jedna jednostka kontrolna z każdego osadu wodnego) mogą być stosowane do monitorowania wymaganych parametrów w osadzie i wodzie podczas okresu aklimatyzacji (zobacz Tabela w pkt 1.8.2.2). Należy dołączyć dwie dodatkowe jednostki kontrolne, gdy badana substancja jest podawana za pomocą rozpuszczalnika celem oznaczenia szkodliwych wpływów na aktywność mikroorganizmów w układzie badawczym.

### 1.9.3. Czas trwania badania i pobieranie próbek

Czas trwania badania nie powinien przekraczać 100 dni (zobacz pozycja 6 piśmiennictwa), a badanie powinno być kontynuowane aż do ustalenia szlaku rozpadu i rozmieszczenia w osadzie/wodzie lub gdy 90 % badanej substancji zanikło przez przemiany i/lub ulotnienie. Próby należy pobierać przynajmniej sześć razy (w tym czas zerowy) z opcjonalnym badaniem wstępnym (zobacz pkt 1.9.4) stosowanym do ustalenia odpowiedniego reżimu pobierania próbek i czasu trwania badania, chyba że istnieją wystarczające dane na temat badanej substancji z badań wcześniejszych. W przypadku hydrofobowych substancji konieczne mogą być dodatkowe pobierania próbek, aby określić ich rozmieszczenie pomiędzy osadem i fazą wodną.

W odpowiednim czasie do analizy pobierane są całe naczynia inkubacyjne (w powtórzeniu). Osad i woda są analizowane oddzielnie<sup>23</sup>. Woda powinna być zebrana ostrożnie tak, by nie wzburzyć osadu. Ekstrakcja i charakteryzacja badanej substancji i produk-

tów przemian powinny być wykonywane według właściwych procedur analitycznych. Należy podjąć wszelkie starania, by usunąć materiał, który mógł adsorbować się na naczyniu inkubacyjnym lub łączącym przewodzie do wyłapywania substancji lotnych.

### 1.9.4. Opcjonalne badanie wstępne

Jeżeli czasu trwania badania i reżimu pobierania próbek nie można ustalić na podstawie innych badań badanej substancji, to właściwe może być wykonanie badania wstępnego, które powinno być wykonane w takich samych warunkach badania, jak podczas badania ścisłego. Warunki doświadczenia i wyniki badania wstępnego, jeżeli było wykonane, powinny być krótko przedstawione w sprawozdaniu.

### 1.9.5. Pomiary i analiza

Należy określić i podać w sprawozdaniu stężenie badanej substancji (jako stężenie i procent stosowanej dawki) i produktów przemian w każdym okresie pobierania próbek. Na ogół zidentyfikować należy produkty przemian wykrywane w  $\geq 10$  % zastosowanej radioaktywności w całym układzie woda-osad, w każdym czasie poboru, chyba że istnieje uzasadnienie, by postępować inaczej. Produkty przemian, których stężenia wzrastają przez cały czas badania, także powinny być brane pod uwagę przy identyfikacji, nawet jeżeli ich stężenia nie przekraczają granic podanych powyżej, ponieważ może to wskazywać na ich trwałość. Takie przypadki należy rozpatrywać indywidualnie, a uzasadnienia przedstawić w sprawozdaniu.

Dla każdego czasu pobierania próbek przedstawić należy wyniki oznaczeń z układów wyłapujących gazy/substancje lotne ( $\text{CO}_2$  i inne tj. lotne związki organiczne). Należy przedstawić stopień mineralizacji. Dla każdego czasu pobierania próbek przedstawić należy nieekstrahowalne (związane) pozostałości w osadzie.

## 2. WYNIKI

### 2.1. Opracowanie wyników

Całkowity bilans wagowy lub odzysk (zobacz pkt 1.7.1) dodanej radioaktywności powinien być obliczony w każdym czasie pobierania próbek. Wyniki należy podać jako procent dodanej radioaktywności. Rozmieszczenie radioaktywności pomiędzy fazą wodną i osadem powinno być przedstawione jako stężenia i procenty w każdym czasie pobrania próbek.

Okres półrozpadu, wartość  $\text{DT}_{50}$  i, jeżeli to właściwe, wartości  $\text{DT}_{75}$  i  $\text{DT}_{90}$  badanej substancji powinny być obliczone wraz z odpowiednimi przedziałami ufności (zobacz pkt 1.7.3). Informacje o rozproszeniu badanej substancji w wodzie i osadzie można otrzymać poprzez zastosowanie odpowiednich narzędzi szacowania. Do tych zalicza się kinetykę pseudopierwszego rzędu, techniki empirycznego dopasowania krzywej, stosując rozwiązania graficzne lub liczbowe i bardziej złożone, jak na przykład pojedynczo- lub wieloprzedziałowe modele. Dalsze szczegóły można znaleźć w odpowiednim piśmiennictwie (zobacz pozycje 35, 36 i 37 piśmiennictwa).

<sup>23</sup> W przypadkach gdzie może łatwo nastąpić gwałtowna reoksydacja beztlenowych produktów przemian, warunki beztlenowe należy utrzymać podczas pobierania próbek i analizy.

Wszystkie sposoby obliczeń mają swoje słabe i silne strony i różnią się swoją złożonością. Założenie kinetyki pierwszego rzędu może być zbytnim uproszczeniem procesów rozkładu i rozmieszczenia, ale jeżeli jest to możliwe, to dostarcza wartość (stałą lub wartość półrozkładu), która jest łatwa w zrozumieniu i ma zastosowanie w modelowaniu symulacyjnym i obliczeniach przewidywanych stężeń środowiskowych. Sposoby empiryczne lub transformacje liniowe mogą dawać lepsze dopasowanie krzywych do danych i przez to pozwalać na lepsze oszacowanie okresów półrozpadu, wartości  $DT_{50}$  i, jeżeli to właściwe, wartości  $DT_{75}$  i  $DT_{90}$ . Zastosowanie wyprowadzonych stałych jest jednak ograniczone. Modele przedziałowe mogą wygenerować wiele pożytecznych stałych o wartości w oszacowaniu ryzyka, które opisują stopień rozkładu w różnych przedziałach i rozproszenie substancji. Powinny być one także stosowane do szacowania stałych stopnia tworzenia i rozpadu głównych produktów przemian. We wszystkich przypadkach zastosowana metoda musi mieć swoje uzasadnienie, a osoba wykonująca doświadczenie powinna wykazać graficznie i/lub statystycznie dobroć dopasowania.

### 3. SPRAWOZDANIE

#### 3.1. Sprawozdanie końcowe

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (wskazując pozycję znaczników, gdy stosowano materiał znakowany radioaktywnie) i ważne własności fizykochemiczne,
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji,
- czystość radiochemiczna znakowanego związku i specyficzna aktywność (gdy to właściwe).

Substancja kontrolna:

- nazwa chemiczna i struktura substancji kontrolnej stosowanej do opisu i/lub identyfikacji produktu przemiany.

Badane osady i wody:

- szczegóły dotyczące miejsca pobrania, dodając, jeżeli to możliwe, dane archiwalne dotyczące zanieczyszczeń,
- wszystkie informacje dotyczące pobierania, okresu przechowywania (jeżeli była przechowywana) i aklimatyzacji układów woda-osad,
- własności prób woda-osad jak przedstawiono w tabeli C.24.1, w pkt 1.8.2.2.

Warunki badania:

- stosowany układ badawczy (np.: przepływowy, biometryczny, sposób wentylacji, metoda mieszania, objętość wody, masa osadu, grubość pokry-

wy wodnej i osadu, rozmiary naczynia doświadczalnego),

- podawanie badanej substancji do układu badawczego: stosowane stężenie, liczba powtórzeń i kontroli, sposób podania badanej substancji (np. zastosowanie rozpuszczalnika) itp.,
- temperatura inkubacji,
- czasy pobierania prób,
- metody ekstrakcji i ich wydajności, a także metody analityczne i granice oznaczalności,
- metody charakteryzacji/identyfikacji produktów przemian,
- odchylenia od sposobu postępowania lub warunki podczas doświadczenia.

Wyniki:

- dane pierwotne reprezentatywnych analiz (wszystkie dane pierwotne należy przechowywać w archiwum zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej),
- powtarzalność i czułość stosowanych metod analitycznych,
- stopień odzysku (wartości % dla zwalidowanego badania podano w pkt 1.7.1),
- przedstawione w postaci tabel wyniki wyrażone jako % stosowanej początkowej dawki i jako mg/kg w wodzie, osadzie i całym systemie (tylko %) dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla produktów przemian i nieekstrahowalnej radioaktywności,
- bilans masy podczas i na koniec badania,
- graficzne przedstawienie przemian w wodzie i osadzie oraz w całym systemie (w tym mineralizacja),
- stopnie mineralizacji,
- okres półrozpadu i wartość  $DT_{50}$  oraz, gdy to właściwe, wartości  $DT_{75}$  i  $DT_{90}$  dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla głównych produktów przemian wraz z przedziałami ufności w wodzie, osadzie i całym układzie,
- oszacowanie kinetyki przemian dla badanej substancji i, gdy to właściwe, dla głównych produktów przemian,
- proponowane szlaki przemian, gdy to właściwe,
- dyskusja wyników.

### 4. PIŚMIENNICTWO

- 1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5—1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

- 2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- 3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- 4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp. 35—37.
- 5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- 6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- 7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.
- 8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- 9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- 10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- 11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945—956 (IUPAC 1984).
- 12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- 13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994—2000): Addenda 6—11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149—158.
- 15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85—114. J. Wiley & Sons.
- 16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631—637.
- 17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with <sup>14</sup>C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661—667.
- 18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- 19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17<sup>th</sup> edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- 20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- 21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038—1039.
- 22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests”, 3—4 July 1991.
- 23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8—10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- 24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858—2868.
- 25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol. 329—338.
- 26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197—203.
- 27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method. PN-ISO 14240-2:2001 Jakość gleby — Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie — Metoda fumigacji — ekstrakcji.
- 28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13—21.
- 29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850—857.
- 30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J.

- (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527—1550.
- 31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499—1509.
- 32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of  $^{14}\text{C}$ -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597—3603.
- 33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- 34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961—968.
- 35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 39, 187—203.
- 36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 33, 47—60.
- 37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp. 1349—1354.

## WYTYCZNE DO BEZTLENOWYCH I TLENOWYCH UKŁADÓW BADAWCZYCH

### Tlenowy układ badawczy

Tlenowy układ badawczy opisany w niniejszej metodzie badawczej składa się z tlenowej warstwy wodnej (typowe stężenia tlenu w zakresie od 7 do 10 mg/l) i warstwy osadu, tlenowej na powierzchni i beztlenowej poniżej powierzchni (typowy zakres potencjału red-oks ( $E_h$ ) w strefie beztlenowej osadu w zakresie od  $-80$  do  $-190$  mV). Nawilgocone powietrze jest przepuszczane nad powierzchnią wody w każdej jednostce inkubacyjnej, aby utrzymać wystarczającą ilość tlenu.

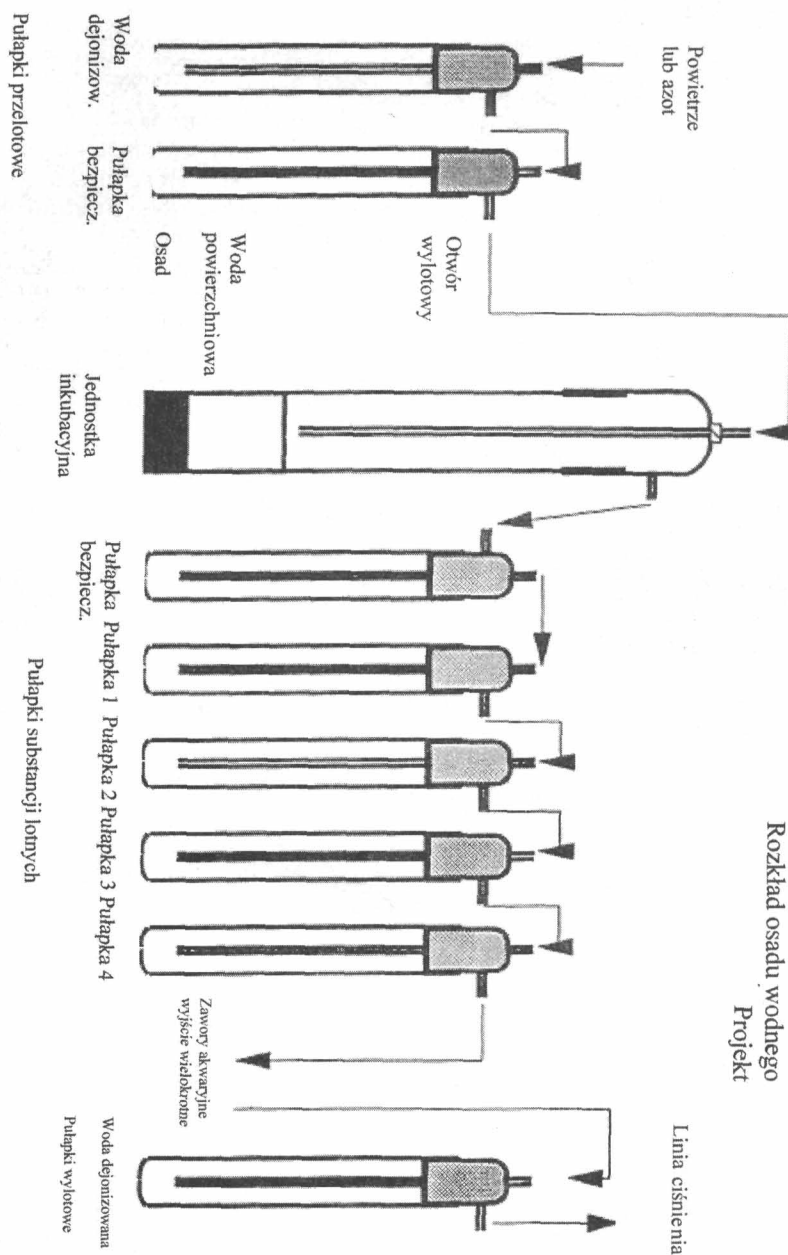
### Beztlenowy układ badawczy

W przypadku beztlenowego układu badawczego sposób postępowania jest taki sam, jak opisany dla układu tlenowego, z wyjątkiem tego, że nad powierzchnią wody w każdej jednostce inkubacyjnej przepuszczany jest azot, by utrzymać jego wystarczającą ilość. Osad i wodę uważa się za beztlenowe, gdy potencjał red-oks ( $E_h$ ) jest niższy niż  $-100$  mV.

W badaniu beztlenowym do oszacowania mineralizacji zalicza się pomiar powstałego dwutlenku węgla i metanu.

## RYSUNEK C.24.1

## PRZYKŁAD GAZOWEGO URZĄDZENIA PRZEPŁYWOWEGO



Pułapka bezpieczeństwa  
pusta

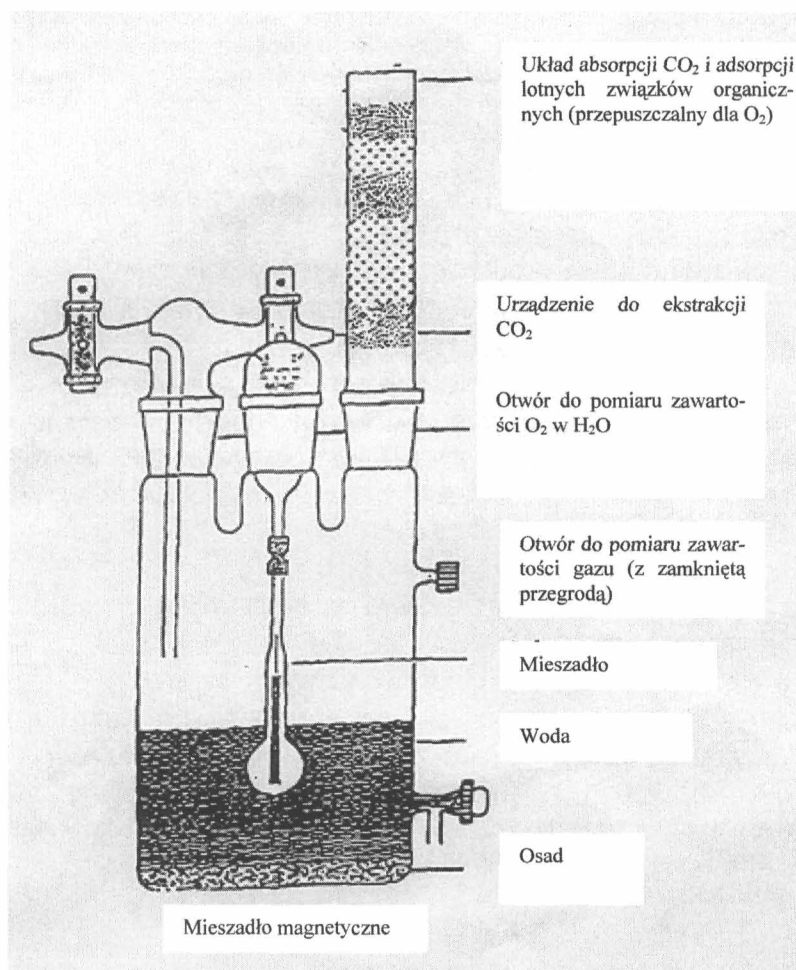
Pułapka 1: glikol etyle-  
nowy do wylapywania  
lotnych związków orga-  
nicznych

Pułapka 2: 0,1M kwas  
siarkowy do wylapywania  
lotnych związków alka-  
licznych

Pułapka 3 & 4: 2M wodo-  
rotlenek sodu do wylapy-  
wania  $\text{CO}_2$  i innych  
kwasowych związków  
lotnych

## RYSUNEK C.24.2

## PRZYKŁAD URZĄDZENIA BIOMETRYCZNEGO



## PRZYKŁAD OBLICZEŃ DAWKI DO NACZYŃ DOŚWIADCZALNYCH

Wewnętrzna średnica cylindra:	= 8 cm
Głębokość kolumny wody, nie wliczając osadu:	= 12 cm
Pole powierzchni: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm <sup>2</sup>
Dawka: 500 g badanej substancji/ha odpowiada 5 µg/cm <sup>2</sup>	
Całkowite µg: $5 \times 50,3$	251,5 µg
Dostosować ilość w odniesieniu do głębokości 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$	30,18 µg
Objętość kolumny wody: $50,3 \times 12$	603 ml
Stężenie w wodzie: $30,18 \div 603$	0,050 µg/ml lub 50 µg/l