

I

(Akty przyjęte na mocy Traktatów WE/Euratom, których publikacja jest obowiązkowa)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 761/2009

z dnia 23 lipca 2009 r.

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

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

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

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008⁽²⁾ zawiera metody badań, służące określeniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji, które należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.
- (2) Należy zaktualizować rozporządzenie (WE) nr 440/2008 w celu uwzględnienia zmian pewnych metod badania i włączenia kilku nowych metod badania przyjętych przez OECD. W sprawie tego wniosku skonsultowano się z zainteresowanymi stronami. Zmiany dostosowują powyższe metody do postępu naukowo-technicznego.

- (3) Należy zmienić przepisy dotyczące prężności par w celu włączenia do nich nowej metody efuzji.
- (4) Należy dodać nową metodę pomiaru długości włókien o geometrycznej średniej ważonej średnicy.
- (5) Właściwe jest zaktualizowanie rozporządzenia (WE) nr 440/2008 w celu uwzględnienia jako priorytet nowej metody badania działania drażniącego na skórę *in vitro*, aby uzyskać zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych, zgodnie z dyrektywą Rady 86/609/EWG z dnia 24 listopada 1986 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych państw członkowskich dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych⁽³⁾. Mimo iż metoda badania działania drażniącego na skórę *in vitro* jest wciąż na etapie dyskusji w ramach OECD, w tym wyjątkowym przypadku należy uwzględnić ją w przedmiotowym rozporządzeniu. Metoda B 46 powinna być uaktualniona tak szybko, jak to możliwe po osiągnięciu porozumienia w ramach OECD, lub w przypadku dostępu do nowych informacji uzasadniających wprowadzenie zmian.
- (6) Przepisy dotyczące badania inhibicji glonów należy poddać przeglądowi w celu uwzględnienia dodatkowych gatunków i spełnienia wymogów oceny zagrożeń i klasyfikacji chemikaliów.
- (7) Należy dodać nową metodę pomiaru tlenowej mineralizacji na powierzchni wody, polegającą na symulacyjnym teście biodegradacji, oraz nową metodę oceny toksyczności dla rodzaju *Lemna*, polegającą na teście zahamowania wzrostu.

⁽¹⁾ Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 358 z 18.12.1986, s. 1.

- (8) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.
- (9) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

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

- 1) w części A wprowadza się następujące zmiany:
- a) rozdział A.4 zastępuje się rozdziałem A.4 w brzmieniu określonym w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;

- b) dodaje się rozdział A.22 w brzmieniu określonym w załączniku II do niniejszego rozporządzenia;
- 2) w części B wprowadza się następujące zmiany:
- dodaje się rozdział B.46 w brzmieniu określonym w załączniku III do niniejszego rozporządzenia;
- 3) w części C wprowadza się następujące zmiany:
- a) rozdział C.3 zastępuje się rozdziałem C.3 w brzmieniu określonym w załączniku IV do niniejszego rozporządzenia;
- b) dodaje się rozdziały C.25 i C.26 w brzmieniu określonym w załączniku V i VI do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

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

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

Sporządzono w Brukseli dnia 23 lipca 2009 r.

W imieniu Komisji
Stavros DIMAS
Członek Komisji

Załącznik I

A.4. Ciśnienie pary

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada wytycznej OECD TG 104 (2004).

1.1. WSTĘP

Niniejsza zmieniona wersja metody A.4 (1) zawiera jedną dodatkową metodę: metodę efuzji, opartą na termogravimetrii izotermicznej, przeznaczoną do substancji chemicznych o bardzo niskich ciśnieniach (do 10^{-10} Pa). Wobec zapotrzebowania na procedury, zwłaszcza dotyczące wyznaczania ciśnienia pary dla substancji o bardzo niskim ciśnieniu pary, dokonano ponownej oceny innych procedur niniejszej metody pod względem zakresu stosowalności.

W stanie równowagi termodynamicznej ciśnienie pary substancji czystej jest jedynie funkcją temperatury. Podstawowe zasady opisano w innym miejscu (2)(3).

Nie ma jednej procedury pomiarowej, która miałaby zastosowanie do całego zakresu ciśnień pary, od poniżej 10^{-10} aż do 10^5 Pa. Niniejsza metoda obejmuje osiem metod pomiaru ciśnienia pary, które mogą być stosowane w różnych zakresach ciśnienia. Porównanie poszczególnych metod pod względem zastosowania i zakresu pomiarowego przedstawiono w tabeli 1. Metody te można stosować tylko do związków, które nie rozkładają się w warunkach badania. W przypadkach gdy ze względów technicznych nie można zastosować metod doświadczalnych, ciśnienie pary można również oszacować, a zalecaną metodę szacowania przedstawiono w dodatku.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Ciśnienie pary substancji określa się jako ciśnienie nasycenia nad substancją w stanie stałym lub ciekłym.

Należy używać jednostki ciśnienia obowiązującej w układzie SI, którą jest paskal (Pa). Poniżej podano inne jednostki, które były stosowane historycznie, wraz z ich współczynnikami przeliczeniowymi:

1 tor	= 1 mm Hg	= $1,333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	= $1,013 \times 10^5$ Pa	
1 bar	= 10^5 Pa	

Jednostką temperatury w układzie SI jest kelwin (K). Przeliczenia stopni Celsjusza na kelwiny dokonuje się według wzoru:

$$T = t + 273,15$$

gdzie T jest temperaturą w skali Kelwina lub temperaturą termodynamiczną, zaś t jest temperaturą w skali Celsjusza.

Tabela 1

Metoda pomiarowa	Substancje		Szacowana powtarzalność	Szacowana odtwarzalność	Zalecany zakres
	Stałe	Ciekłe			
Metoda dynamiczna	Łatwotopliwe	Tak	do 25 % 1–5 %	do 25 % 1–5 %	10^3 Pa do 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa do 10^5 Pa
Metoda statyczna	Tak	Tak	5–10 %	5–10 %	10 Pa do 10^5 Pa 10^{-2} Pa do 10^5 Pa (1)
Metoda izoteniskoopowa	Tak	Tak	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa do 10^5 Pa

Metoda pomiarowa	Substancje		Szacowana powtarzalność	Szacowana odtwarzalność	Zalecany zakres
	Stałe	Ciekłe			
Metoda efuzji: równowaga ciśnienia pary	Tak	Tak	5–20 %	do 50 %	10 ⁻³ do 1 Pa
Metoda efuzji: komórka Knudsena	Tak	Tak	10–30 %	—	10 ⁻¹⁰ do 1 Pa
Metoda efuzji: grawimetria izotermiczna	Tak	Tak	5–30 %	do 50 %	10 ⁻¹⁰ do 1 Pa
Metoda nasycania gazu	Tak	Tak	10–30 %	do 50 %	10 ⁻¹⁰ do 10 ³ Pa
Metoda wirującego rotora	Tak	Tak	10–20 %	—	10 ⁻⁴ do 0,5 Pa

(¹) Używając manometru pojemnościowego.

1.3. ZASADA BADANIA

Na ogół ciśnienie pary wyznacza się w różnych temperaturach. W ograniczonym zakresie temperatury logarytm ciśnienia pary substancji czystej jest liniową funkcją odwrotności temperatury termodynamicznej, zgodnie z uproszczonym równaniem Clapeyrona-Clausiusa:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3RT} + \text{stała}$$

gdzie:

- p = ciśnienie pary w paskalach,
- ΔH_v = ciepło parowania w J mol⁻¹,
- R = uniwersalna stała gazowa: 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹,
- T = temperatura w K.

1.4. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma potrzeby stosowania substancji odniesienia. Służą one głównie do sporadycznego sprawdzenia działania metody, jak również do umożliwienia porównania wyników uzyskanych różnymi metodami.

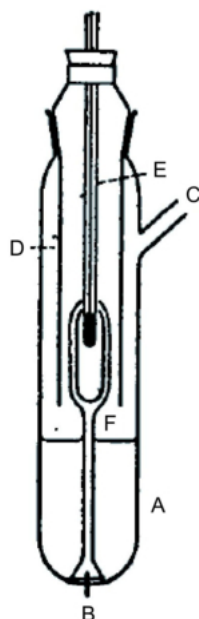
1.5. OPIS METODY

1.5.1. Metoda dynamiczna (metoda Cottrella)

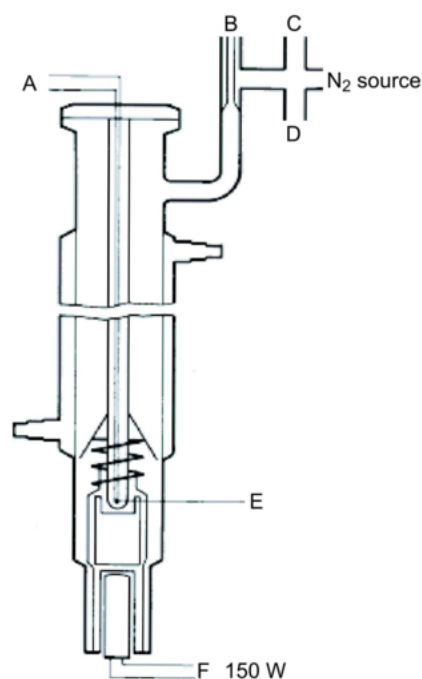
1.5.1.1. Zasada

Ciśnienie pary wyznacza się, mierząc temperaturę wrzenia substancji przy różnych określonych wartościach ciśnienia w przybliżonych granicach od 10³ do 10⁵ Pa. Metoda ta jest również zalecana do wyznaczania temperatury wrzenia. Do tego celu jest ona użyteczna do temperatury 600 K. Temperatury wrzenia cieczy są o około 0,1 °C wyższe na głębokości 3 do 4 cm niż na powierzchni z powodu ciśnienia słupa cieczy. W metodzie Cottrella (4) termometr umieszcza się w parze powyżej powierzchni cieczy tak, iż wrząca ciecz w sposób ciągły omywa zbiornik termometru. Zbiornik termometru pokrywa cienka warstwa cieczy, która jest w równowadze z parą pod ciśnieniem atmosferycznym. W ten sposób termometr wskazuje rzeczywistą temperaturę wrzenia, bez błędów powodowanych przegrzaniem lub ciśnieniem hydrostatycznym. Pompę pierwotnie zastosowaną przez Cottrella przedstawiono na rysunku 1. Rurka A zawiera wrzącą ciecz. Wtopiony w dno platynowy drut B ułatwia równomierne wrzenie. Boczna rurka C prowadzi do skraplacza, zaś osłona D zapobiega przedostawaniu się zimnych kropli do termometru E. Podczas wrzenia cieczy zawartej w rurce A wychwycone przez lejek pęcherzyki i ciecz są wylewane poprzez dwa ramiona pompki F na zbiornik termometru.

Rysunek 1



Rysunek 2



Pompa Cottrella (4)

- A: Termopara
- B: Próżniowa objętość buforowa
- C: Ciśnieniomierz
- D: Próżnia
- E: Punkt pomiarowy
- F: Element grzewczy ok. 150 W

1.5.1.2. Przyrząd

Na rysunku 2 przedstawiono bardzo dokładny przyrząd wykorzystujący zasadę Cottrella. Składa się on z rurki z sekcją wrzenia w dolnej części, chłodnicą w części środkowej oraz wylotem i kołnierzem w części górnej. Pompa Cottrella jest umieszczona w sekcji wrzenia, która jest ogrzewana za pomocą wkładu elektrycznego. Temperatura jest mierzona przez termoparę z osłoną lub termometr oporowy wprowadzony poprzez kołnierz u góry. Wylot jest podłączony do układu regulacji ciśnienia. Układ ten zawiera pompę próżniową, objętość buforową, manostat do wpuszczania azotu celem regulacji ciśnienia oraz manometr.

1.5.1.3. Procedura

Substancję umieszcza się w sekcji wrzenia. W przypadku niesproszkowanych ciał stałych można napotkać problemy, lecz niekiedy można je rozwiązać, ogrzewając płaszcz chłodzący. Przyrząd zamyka się szczelnie na kołnierzu, a substancję poddaje się odgazowaniu. Metoda ta nie nadaje się do pomiaru substancji pieniających się.

Następnie nastawia się najniższe żądane ciśnienie i włącza się ogrzewanie. Równocześnie czujnik temperatury podłącza się do rejestratora.

Równowaga jest osiągnięta, gdy przy stałym ciśnieniu rejestrowana jest stała temperatura wrzenia. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do uderzenia podczas wrzenia. Ponadto musi nastąpić całkowite skroplenie na chłodnicy. Podczas oznaczania ciśnienia pary łatwotopliwych substancji stałych należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zablokowania skraplacza.

Po zarejestrowaniu punktu równowagi nastawia się wyższe ciśnienie. Proces kontynuuje się w ten sposób aż do osiągnięcia ciśnienia 10^5 Pa (uzyskując ogółem około 5 do 10 punktów pomiarowych). Dla sprawdzenia należy powtórzyć punkty równowagi przy malejących ciśnieniach.

1.5.2. **Metoda statyczna**1.5.2.1. *Zasada*

W metodzie statycznej (5) ciśnienie pary w stanie równowagi termodynamicznej wyznacza się w określonej temperaturze. Metoda ta nadaje się do substancji i cieczy wieloskładnikowych oraz ciał stałych w przedziale od 10^{-1} do 10^5 Pa, a pod warunkiem zachowania staranności również w przedziale od 1 do 10 Pa.

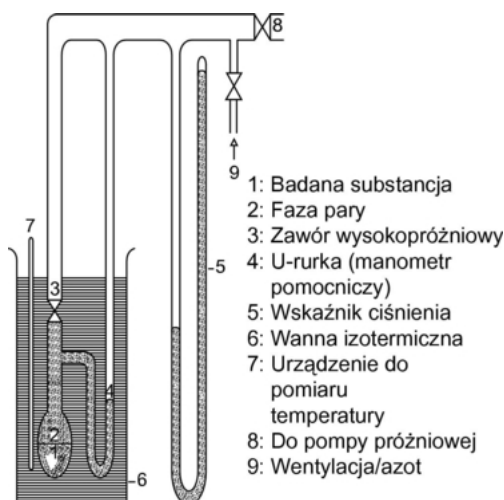
1.5.2.2. *Przyrząd*

Przyrząd pomiarowy składa się z łaźni stałotemperaturowej (dokładność $\pm 0,2$ K), pojemnika na próbkę podłączonego do przewodu próżniowego, manometru oraz układu do regulacji ciśnienia. Komora próbki (rysunek 3a) jest podłączona do przewodu próżniowego poprzez zawór i manometr różnicowy (U-rurkę zawierającą odpowiednią ciecz manometryczną), który służy jako wskaźnik zera. Do zastosowania w manometrze różnicowym nadają się: rtęć, silikony i ftalany, w zależności od zakresu ciśnienia i zachowania się badanej substancji pod względem chemicznym. Ze względu na ochronę środowiska naturalnego należy w miarę możliwości unikać stosowania rtęci. Badana substancja nie może w dostrzegalny sposób rozpuszczać się w cieczy zawartej w U-rurce ani wchodzić z nią w reakcje. Zamiast U-rurki można użyć ciśnieniomierza (rysunek 3b). W manometrze można stosować rtęć w zakresie od ciśnienia normalnego do 10^2 Pa, natomiast płyny silikonowe i ftalany nadają się do użycia w zakresie ciśnienia poniżej 10^2 Pa aż do 10 Pa. Istnieją inne ciśnieniomierze, których można używać przy ciśnieniu poniżej 10^2 Pa, zaś podgrzewanych przepływowych manometrów pojemnościowych można używać nawet przy ciśnieniu poniżej 10^{-1} Pa. Temperaturę mierzy się na zewnętrznej ścianie zbiornika zawierającego próbkę lub w samym zbiorniku.

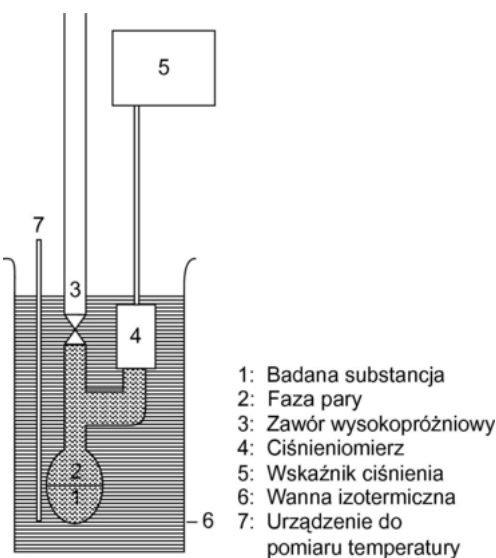
1.5.2.3. *Procedura*

Używając przyrządu przedstawionego na rysunku 3a, napełnić U-rurkę wybraną cieczą, którą przed dokonaniem odczytów należy odgazować w podwyższonej temperaturze. Badaną substancję umieszcza się w przyrządzie i odgazowuje w obniżonej temperaturze. W przypadku próbki wieloskładnikowej temperatura powinna być dostatecznie niska dla zapewnienia, że skład materiału nie ulegnie zmianie. Równowagę można osiągnąć szybciej dzięki mieszaniu. Próbkę można schłodzić za pomocą ciekłego azotu lub suchego lodu, lecz należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do skroplenia powietrza lub cieczy pompy. Przy otwartym zaworze nad zbiornikiem próbki włącza się na kilka minut zasysanie, aby usunąć powietrze. W razie potrzeby operację odgazowania powtarza się wielokrotnie.

Rysunek 3a



Rysunek 3b



Gdy próbka jest podgrzewana przy zamkniętym zaworze, ciśnienie pary wzrasta. Powoduje to zmianę równowagi cieczy w U-rurce. Aby skompensować tę zmianę, do przyrządu wprowadza się azot lub powietrze, aż do ponownego wyzerowania się różnicowego wskaźnika ciśnienia. Wymagane do tego ciśnienie można odczytać z manometru lub z przyrządu o wyższej dokładności. Ciśnienie to odpowiada ciśnieniu pary substancji w temperaturze pomiaru. Używając przyrządu przedstawionego na rysunku 3b, ciśnienie pary odczytuje się bezpośrednio.

Ciśnienie pary wyznacza się w odpowiednio małych odstępach czasu (w sumie około 5–10 punktów pomiarowych) aż dożądanego maksimum temperatury.

Dla sprawdzenia należy powtórzyć odczyty przy malejącej temperaturze. Jeżeli wartości otrzymane z powtórzonych odczytów nie pokrywają się z krzywą uzyskaną dla temperatury rosnącej, to może to wynikać z jednej z następujących sytuacji:

- (i) próbka nadal zawiera powietrze (np. w przypadku substancji o dużej lepkości) lub substancje o niskiej temperaturze wrzenia, wydzielające się podczas ogrzewania;
- (ii) substancja ulega reakcji chemicznej w badanym zakresie temperatury (np. rozkładowi, polimeryzacji).

1.5.3. Metoda z użyciem izoteniskopu

1.5.3.1. Zasada

Izoteniskop (6) oparty jest na zasadzie metody statycznej. Metoda ta polega na umieszczeniu próbki w bańce utrzymanej w stałej temperaturze i podłączonej do manometru oraz pompy próżniowej. Zanieczyszczenia bardziej lotne od badanej substancji usuwa się przez odgazowanie przy obniżonym ciśnieniu. Ciśnienie pary próbki w wybranych temperaturach jest równoważone znanym ciśnieniem gazu obojętnego. Izoteniskop został skonstruowany do pomiaru ciśnienia pary pewnych ciekłych węglowodorów, lecz nadaje się również do badania substancji stałych. Metoda ta zwykle nie nadaje się do układów wieloskładnikowych. Wyniki obciążone są jedynie nieznacznym błędem w przypadku próbek zawierających zanieczyszczenia nielotne. Zalecany zakres wynosi od 10^2 do 10^5 Pa.

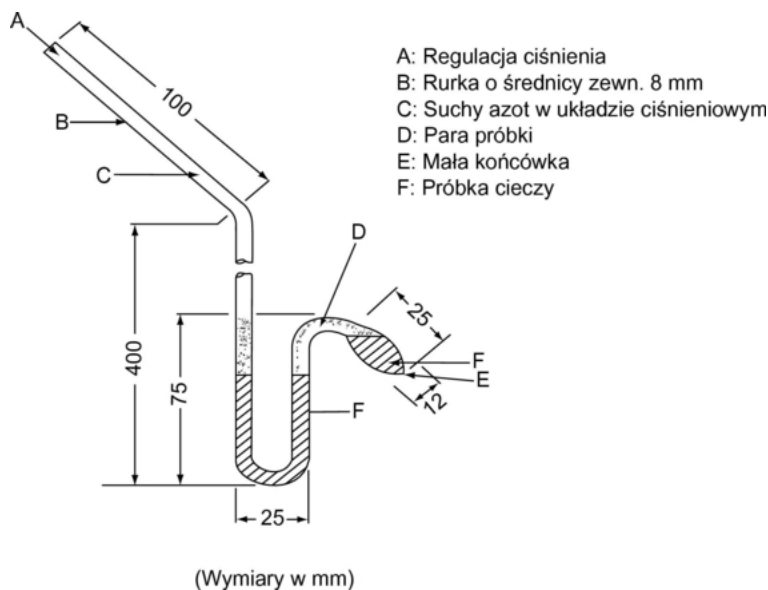
1.5.3.2. Przyrząd

Przykład urządzenia pomiarowego przedstawiono na rysunku 4. Pełny opis można znaleźć w ASTM D 2879–86 (6).

1.5.3.3. Procedura

W przypadku cieczy badana substancja sama służy jako płyn w manometrze różnicowym. Do izoteniskopu wprowadza się ilość cieczy wystarczającą do wypełnienia bańki i krótszego ramienia manometru. Izoteniskop przyłącza się do układu próżniowego i usuwa z niego powietrze, a następnie napełnia azotem. Opróżnianie i oczyszczanie układu powtarza się dwukrotnie, aby usunąć resztki tlenu. Napełniony izoteniskop ustawia się w położeniu poziomym, tak aby próbka rozłożyła się cienką warstwą w bańce próbnej i manometrze. Ciśnienie w układzie obniża się do 133 Pa, a próbkę łagodnie się ogrzewa, aż zacznie wrzeć (usunięcie rozpuszczonych gazów). Następnie izoteniskop ustawia się, tak aby próbka powróciła do bańki i napełniła krótsze ramię manometru. Ciśnienie utrzymywane jest na poziomie 133 Pa. Wyciąganą końcówkę bańki próbkowej podgrzewa się małym płomieniem, aż wydzielona z próbki para rozpręży się dostatecznie, aby wyprzeć część próbki z górnej części bańki i ramienia manometru, tworząc wypełnioną parą przestrzeń wolną od azotu. Izoteniskop umieszcza się następnie w łaźni stałotemperaturowej, a ciśnienie azotu nastawia się, tak aby równe było ciśnieniu próbki. W stanie równowagi ciśnienie azotu równe jest ciśnieniu pary substancji.

Rysunek 4



W przypadku substancji stałych i w zależności od zakresu ciśnienia i temperatury stosuje się cieczy manometryczne, takie jak płyny silikonowe lub ftalany. Odgazowaną ciecz manometryczną umieszcza się w bańce wykonanej na długim ramieniu izoteniskopu. Następnie badaną substancję stałą wkłada się do bańki próbkowej i odgazowuje w podwyższonej temperaturze. Po wykonaniu tego izoteniskop przechyla się, tak aby ciecz manometryczna mogła wpłynąć do U-rurki.

1.5.4. Metoda efuzji: równowaga ciśnienia pary (7)

1.5.4.1. Zasada

Próbkę badanej substancji ogrzewa się w małym piecu i umieszcza w dzwone szklanym, w którym wytworzono próżnię. Piec przykryty jest pokrywą, która posiada niewielkie otwory o znanej średnicy. Ulatniająca się przez otwory para substancji kierowana jest na szalę wagi o wysokiej czułości, która również jest zamknięta w opróżnionym dzwone szklanym. W niektórych rozwiązaniach konstrukcyjnych szala wagi umieszczona jest w komorze chłodzącej, która zapewnia odprowadzenie ciepła na zewnątrz. Promieniowanie powoduje ochłodzenie szali wagi, tak iż ulatniająca się para skrapla się na niej. Pęd strumienia pary działa na szalę jak siła. Ciśnienie pary można wyprowadzić dwoma sposobami: bezpośrednio z siły działającej na szalę wagi oraz z szybkości parowania przy użyciu równania Hertza-Knudsen (2):

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

gdzie:

G = szybkość parowania ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$),

M = masa molowa (g mol^{-1}),

T = temperatura (K),

R = uniwersalna stała gazowa ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$),

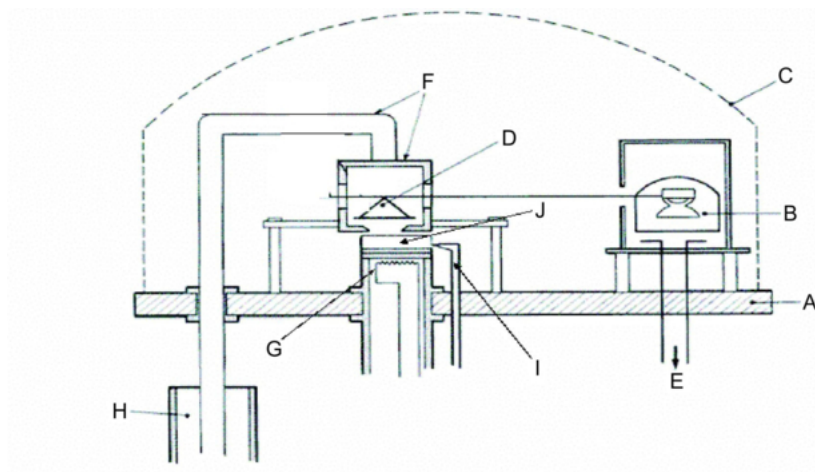
P = ciśnienie pary (Pa).

Zalecany zakres wynosi od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2. *Przyrząd*

Schemat ideowy przyrządu pomiarowego zilustrowano na rysunku 5.

Rysunek 5



- | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| A: Płyta podstawy | F: Komora chłodząca i pręt chłodzący |
| B: Przyrząd z ruchomą cewką | G: Piec wyparki |
| C: Dzwon szklany | H: Naczynie Dewara z ciekłym azotem |
| D: Waga z szalą | I: Pomiar temperatury próbki |
| E: Urządzenie do pomiaru próżni | J: Badana substancja |

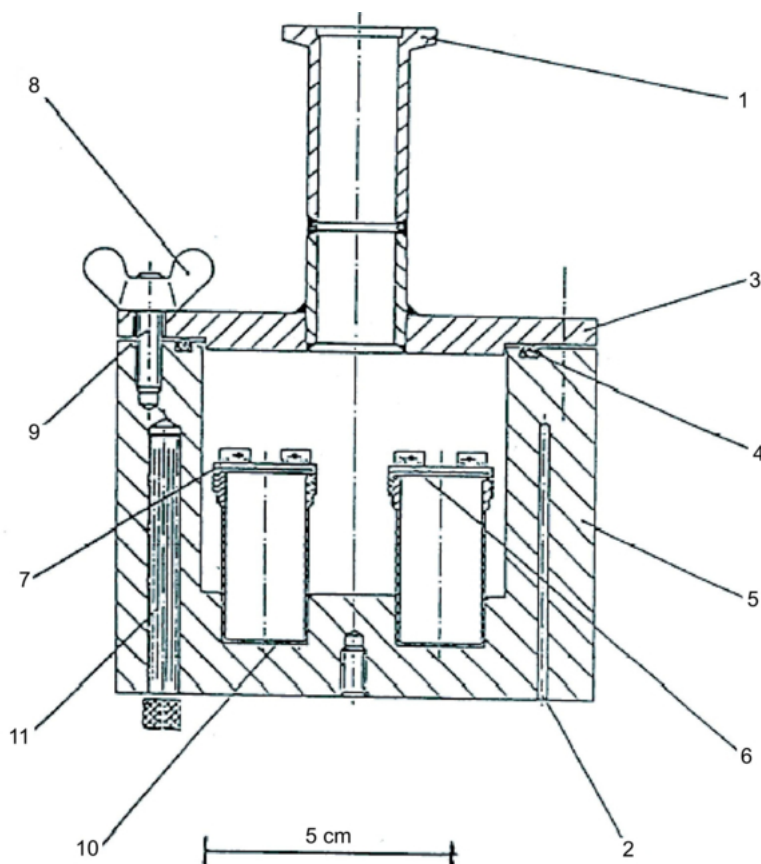
1.5.5. **Metoda efuzji: komórka Knudsena**1.5.5.1. *Zasada*

Metoda ta polega na oszacowaniu masy badanej substancji w postaci pary wypływającej w jednostce czasu z komórki Knudsena (8) przez mikrootwór w warunkach wysokiej próżni. Masę pary, która wypłynęła, można określić poprzez wyznaczenie straty masy komórki lub przez skroplenie pary w niskiej temperaturze i wyznaczenie masy ulotnionej substancji przy pomocy chromatografii. Ciśnienie pary oblicza się stosując zależność Hertza-Knudsena (zob. sekcja 1.5.4.1) ze współczynnikami korekcji w zależności od parametrów przyrządu pomiarowego (9). Zalecany zakres wynosi od 10^{-10} do 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Przyrząd*

Schemat ideowy przyrządu pomiarowego zilustrowano na rysunku 6.

Rysunek 6



- | | |
|--|---|
| 1: Podłączenie do układu próżniowego | 7: Pokrywa gwintowana |
| 2: Pochwy platynowego termometru oporowego lub urządzenia do pomiaru i regulacji temperatury | 8: Nakrętki motylkowe |
| 3: Pokrywa zbiornika próżniowego | 9: Śruby |
| 4: Pierścień uszczelniający (O-ring) | 10: Komórki efuzyjne ze stali nierdzewnej |
| 5: Aluminiowy zbiornik próżniowy | 11: Wkładka grzewcza |
| 6: Urządzenie do zakładania i wyjmowania komórek efuzyjnych | |

1.5.6. Metoda efuzji: termogravimetria izotermiczna

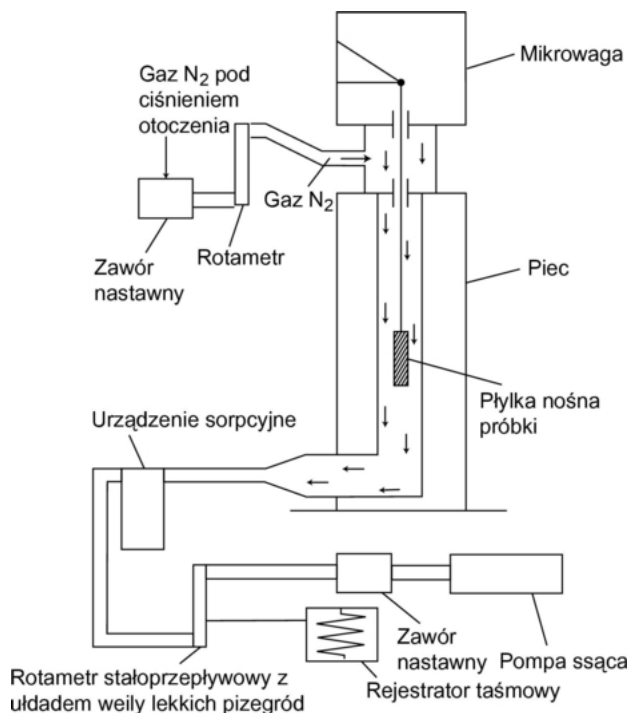
1.5.6.1. Zasada

Metoda ta polega na wyznaczeniu szybkości przyspieszonego parowania badanej substancji w podwyższonych temperaturach i pod ciśnieniem otoczenia przy pomocy gravimetrii (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Wartości szybkości parowania v_T otrzymuje się, poddając wybrany związek działaniu atmosfery powoli płynącego gazu obojętnego i obserwując utratę ciężaru w określonych, stałych temperaturach T (wyrażonych w kelwinach) w ciągu odpowiednich okresów. Wartości ciśnienia pary p_T oblicza się na podstawie wartości v_T przy użyciu liniowej zależności pomiędzy logarytmem ciśnienia pary i logarytmem szybkości parowania. W razie potrzeby można dokonać ekstrapolacji do temperatur 20 i 25 °C za pomocą analizy regresji $\log p_T$ w zależności od $1/T$. Metoda ta nadaje się do substancji o ciśnieniu pary sięgającym minimum 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) i o czystości możliwie jak najbliższej 100 % dla uniknięcia błędnej interpretacji zmierzonych wartości utraty ciężaru.

1.5.6.2. Przyrząd

Schemat ideowy zestawu doświadczalnego przedstawiono na rysunku 7.

Rysunek 7



Płytkę nośną próbki, zawieszoną na mikrowadze w komorze o regulowanej temperaturze, jest omiotana strumieniem suchego gazowego azotu, który porywa odparowane cząsteczki badanej substancji. Po opuszczeniu komory strumień gazu jest oczyszczany przez urządzenie sorpcyjne.

1.5.6.3. Procedura

Badaną substancję nakłada się na powierzchnię chropowatej płytki szklanej w postaci jednorodnej warstwy. W przypadku substancji stałych płytkę zwilża się równomiernie roztworem substancji w odpowiednim rozpuszczalniku i suszy w atmosferze obojętnej. Do celu pomiaru pokrytą płytkę zawieszają się w analizatorze termogravimetrycznym, a następnie mierzy się w sposób ciągły utratę jej ciężaru w funkcji czasu.

Szybkość parowania v_T w określonej temperaturze oblicza się na podstawie utraty ciężaru Δm płytki próbnej za pomocą wzoru:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} (\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1})$$

gdzie F jest polem powierzchni nałożonej substancji badanej, zwykle równym polu powierzchni płytki próbnej, zaś t jest czasem utraty ciężaru Δm .

Ciśnienie pary p_T oblicza się na podstawie szybkości parowania v_T , za pomocą wzoru:

$$\text{Log } p_T = C + D \log v_T$$

gdzie C i D są stałymi charakterystycznymi dla użytego zestawu doświadczalnego, zależnymi od średnicy komory pomiarowej i od natężenia przepływu gazu. Stałe te należy wyznaczyć raz poprzez wykonanie pomiaru dla grupy związków o znanym ciśnieniu pary i dokonanie regresji zależności $\log p_T$ od $\log v_T$ (11)(21)(22).

Zależność pomiędzy ciśnieniem pary p_T a temperaturą T w kelwinach jest dana wzorem:

$$\text{Log } p_T = A + B 1/T$$

gdzie A i B są stałymi uzyskanymi z regresji zależności $\log p_T$ od $1/T$. Za pomocą tego równania można obliczyć ciśnienie pary dla dowolnej innej temperatury przez ekstrapolację.

1.5.7. Metoda nasycania gazu (23)

1.5.7.1. Zasada

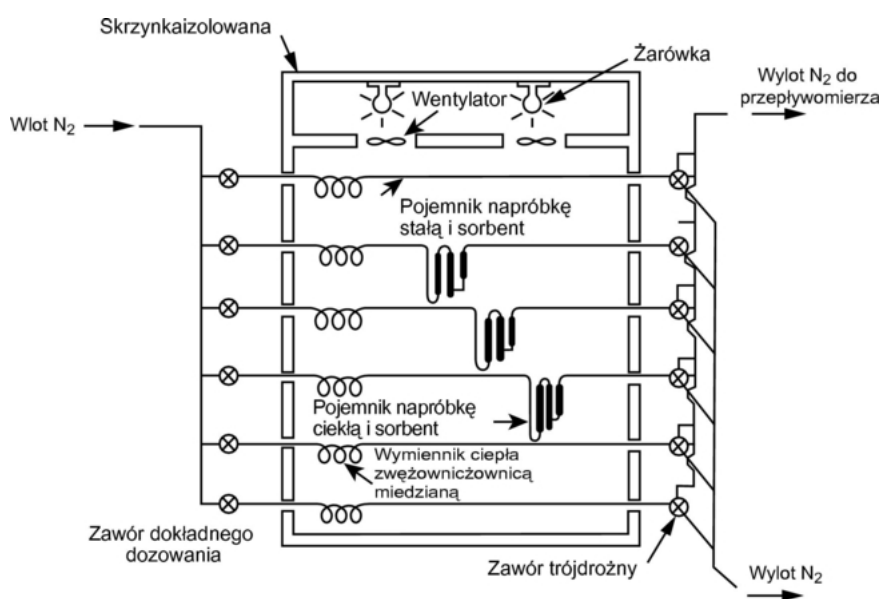
Gaz obojętny o temperaturze pokojowej przepuszcza się przy znanym natężeniu przepływu przez próbkę badanej substancji lub ponad nią dostatecznie powoli, aby zapewnić nasycenie. Osiągnięcie nasycenia w fazie gazowej ma decydujące znaczenie. Przenoszona substancja jest wychwytywana (zwykle przy użyciu sorbentu), po czym określa się jej ilość. Alternatywnie wobec wychwytywania i analizy pary, do określenia ilości przenoszonego materiału można wykorzystać współbieżne techniki analityczne, np. chromatografię gazową. Ciśnienie pary oblicza się w oparciu o założenia, że zachowane jest prawo gazu doskonałego i że całkowite ciśnienie mieszaniny gazów jest równe sumie ciśnień gazów będących jej składnikami. Ciśnienie cząstkowe badanej substancji, tj. ciśnienie pary, oblicza się ze znanej całkowitej objętości gazu i masy przenoszonego materiału.

Procedura nasycania gazu ma zastosowanie do stałych lub ciekłych substancji chemicznych. Może być stosowana do ciśnień pary sięgających minimum 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoda ta jest najbardziej pewna dla ciśnień pary poniżej 10^3 Pa. Powyżej tej wartości ciśnienie pary jest zwykle oszacowywane zbyt wysoko, prawdopodobnie na skutek tworzenia się aerozolu. Ponieważ pomiary ciśnienia pary wykonuje się w temperaturze pokojowej, nie ma konieczności ekstrapolacji danych z wysokich temperatur i unika się wynikających stąd często poważnych błędów.

1.5.7.2. Przyrząd

Procedura wymaga użycia komory stałotemperaturowej. Szkic na rysunku 8 przedstawia komorę zawierającą po trzy pojemniki na próbki stałe i ciekłe, które umożliwiają potrójne analizy próbki stałej substancji stałej lub ciekłej. Temperatura jest regulowana z dokładnością do $\pm 0,5$ °C lub lepszą.

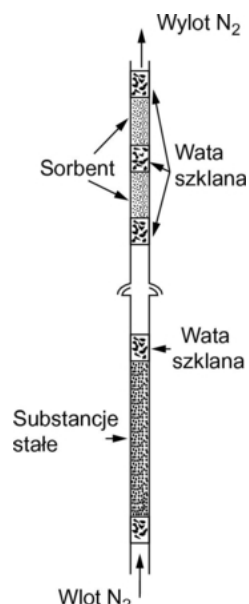
Rysunek 8



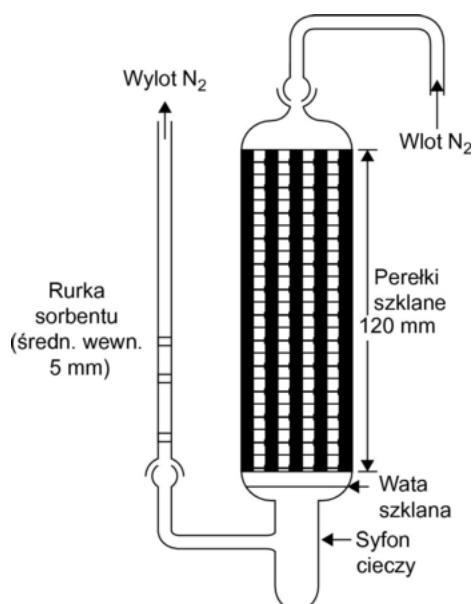
Zwykle jako obojętny gaz nośny używany jest azot, lecz niekiedy może być wymagany inny gaz (24). Gaz nośny musi być suchy. Strumień gazu zostaje rozdzielony na 6 strumieni regulowanych przez zawory iglicowe (o wielkości otworu ok. 0,79 mm) i wpływa do skrzynki poprzez rurkę miedzianą o średnicy wewnętrznej 3,8 mm. Po wyrównaniu się temperatury gaz przepływa przez próbkę i pułapkę sorbentową, a następnie wypływa z komory.

Próbki substancji stałych umieszcza się w rurce szklanej o średnicy wewnętrznej 5 mm pomiędzy korkami z waty szklanej (zob. rysunek 9). Rysunek 10 przedstawia pojemnik na próbkę ciekłą i układ sorbentu. Najwyższą odzwiercadelność pomiaru ciśnienia pary cieczi zapewnia metoda polegająca na oblaniu ciecżą perełek szklanych lub obojętnego sorbentu (np. krzemionki) i napełnieniu zbiornika tymi perełkami. Alternatywnie gaz nośny można przepuścić przez grubą frytę, a następnie w postaci pęcherzyków przez kolumnę z badaną substancją ciekłą.

Rysunek 9



Rysunek 10



Układ sorbentu zawiera przednią i rezerwową sekcję sorbentu. Przy bardzo niskich ciśnieniach pary na sorbencie zatrzymywane są jedynie małe ilości i poważnym problemem może być adsorpcja na wełnie szklanej i rurce szklanej pomiędzy próbką a sorbentem.

Innym skutecznym sposobem zbierania odparowanego materiału są pułapki chłodzone stałym CO_2 . Nie powodują one wstecznego ciśnienia na kolumnie saturatora, a ponadto łatwe jest wybranie wychwyconego materiału w sposób ilościowy.

1.5.7.3. Procedura

Natężenie przepływu wypływającego gazu nośnego mierzy się w temperaturze pokojowej. Natężenie przepływu jest często sprawdzane w trakcie doświadczenia w celu zapewnienia jego odpowiedniej wartości dla łącznej objętości gazu nośnego. Zaleca się pomiar ciągły za pomocą przepływomierza masowego. Nasylenie fazy gazowej może wymagać znacznego czasu kontaktu, a zatem dość niskiego natężenia przepływu gazu (25).

Na koniec doświadczenia analizę przeprowadza się oddzielnie dla przedniej i rezerwowej sekcji sorbentu. Związek w każdej sekcji desorbuje się przez dodanie rozpuszczalnika. Otrzymane w wyniku tego roztwory poddaje się analizie ilościowej w celu określenia masy zdesorbowanej z każdej sekcji. O wyborze metody analitycznej (a także o wyborze sorbentu i rozpuszczalnika desorbującego) decyduje charakter badanej substancji. Sprawność desorpcji wyznacza się przez wstrzyknięcie znanej ilości próbki do sorbentu, zdesorbowanie jej i przeprowadzenie analizy odzyskanej ilości. Ważne jest, aby sprawność desorpcji sprawdzić przy stężeniu próbki występującym w warunkach badania lub zbliżonym do niego.

Aby zapewnić nasylenie gazu nośnego badaną substancją stosuje się trzy różne natężenia przepływu. Jeżeli obliczone ciśnienie pary wykazuje brak zależności od natężenia przepływu, gaz uznaje się za nasycony.

Ciśnienie pary oblicza się przy pomocy równania:

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

gdzie:

- p = ciśnienie pary (Pa),
 W = masa odparowanej substancji (g),
 V = objętość nasyconego gazu (m³),
 R = uniwersalna stała gazowa 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹),
 T = temperatura (K),
 M = masa molowa badanej substancji (g mol⁻¹).

Zmierzone wartości należy skorygować pod względem różnic ciśnienia i temperatury pomiędzy przepływomierzem a saturatorem.

1.5.8. Wirujący rotor

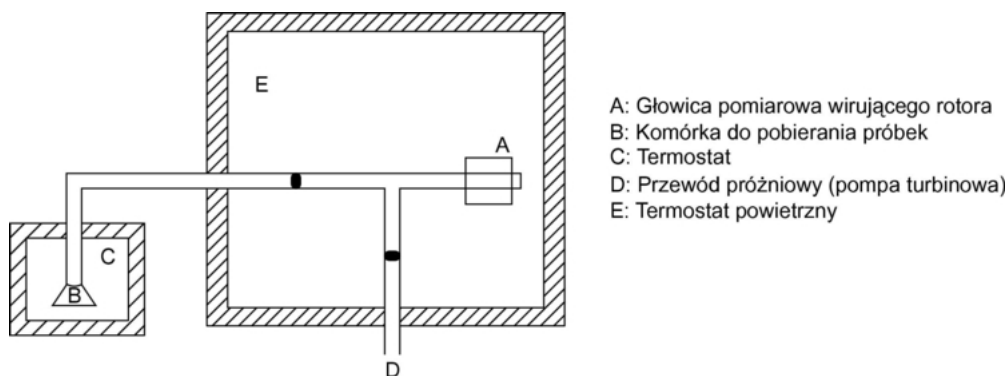
1.5.8.1. Zasada

Metoda ta wykorzystuje lepkościomierz z wirującym rotorem, w którym elementem pomiarowym jest kulka stalowa zawieszona w polu magnetycznym i wprowadzana w ruch przez wirujące pola (26)(27)(28). Pomiar prędkości jej wirowania umożliwiają cewki przetwornikowe. Po osiągnięciu przez kulkę określonej prędkości obrotowej (zwykle około 400 obrotów na sekundę) zasilanie energią zostaje wyłączone i następuje wytracanie prędkości spowodowane tarcieniem gazu. Spadek prędkości obrotowej mierzony jest w funkcji czasu. Ciśnienie pary wyznacza się na podstawie zależnego od ciśnienia spowalniania ruchu kulki stalowej. Zalecany zakres wynosi od 10⁻⁴ do 0,5 Pa.

1.5.8.2. Przyrząd

Schemat zestawu doświadczalnego pokazano na rysunku 11. Głowicę pomiarową umieszcza się w komorze o stałej temperaturze regulowanej z dokładnością do 0,1 °C. Pojemnik z próbką umieszcza się w oddzielnej komorze, w której temperatura jest również regulowana z dokładnością do 0,1 °C. Wszystkie pozostałe części zestawu są utrzymywane w wyższej temperaturze, aby zapobiec kondensacji. Cały przyrząd połączony jest z układem wysokopróżniowym.

Rysunek 11



2. DANE I SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA

2.1. DANE

Ciśnienie pary badane dowolną z powyższych metod należy wyznaczyć dla co najmniej dwóch temperatur. Zaleca się przeprowadzenie pomiarów dla trzech lub więcej wartości temperatury w przedziale od 0 do 50 °C, aby sprawdzić liniowość krzywej ciśnienia pary. W przypadku metody efuzji (komórki Knudsen'a i termogravimetrii izotermicznej) oraz metody nasycania gazu zaleca się zakres temperatury pomiaru w granicach od 120 do 150 °C, zamiast od 0 do 50 °C.

2.2. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

- wskazanie zastosowanej metody,
- dokładne określenie substancji (nazwa i zanieczyszczenia) oraz zabieg wstępnego oczyszczania, o ile jest zastosowany,
- co najmniej dwie — a najlepiej trzy lub więcej — wartości ciśnienia pary i temperatury wymagane w przedziale od 0 do 50 °C (lub od 120 do 150 °C),
- co najmniej jedna z wartości temperatury powinna wynosić 25 °C lub poniżej, jeżeli jest to technicznie możliwe zgodnie z wybraną metodą,
- wszystkie dane wyjściowe,
- krzywą zależności $\log p$ od $1/T$,
- oszacowanie ciśnienia pary w temperaturze 20 lub 25 °C.

Jeśli obserwowana jest przemiana (zmiana stanu, rozkład), to należy podać następujące informacje:

- charakter zmiany,
- temperaturę, w której zachodzi zmiana przy ciśnieniu atmosferycznym,
- ciśnienie pary w temperaturze 10 i 20 °C poniżej temperatury przemiany oraz 10 i 20 °C powyżej tej temperatury (chyba że przemiana zachodzi ze stanu stałego w gazowy).

Należy podać wszystkie informacje i uwagi mające znaczenie dla interpretacji wyników, zwłaszcza w odniesieniu do zanieczyszczeń i fizycznego stanu substancji.

3. LITERATURA

- (1) *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L 383 A, 26–47 (1992).
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Le Neindre, B., Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- (3) Weissberger R., ed. (1959). *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- (5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa — Static method.*
- (6) ASTM D 2879–86, *Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.*
- (7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.*
- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), *Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science* 56, 521–532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual, Twelfth Edition* (2000).

- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22–28.
 - (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269–278.
 - (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117–122.
 - (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137–147.
 - (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393–400.
 - (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161–168.
 - (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27–31.
 - (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300–310.
 - (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512–20.
 - (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.
 - (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002).
 - (23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.
 - (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
 - (25) Westcott et al. (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
 - (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
 - (27) Comsa G., Fremerey J.K., Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
 - (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.
-

Dodatek

Metoda szacowania

WSTĘP

Szacunkowych wartości ciśnienia pary można użyć:

- do ustalenia, która z metod doświadczalnych jest odpowiednia,
- do podania wartości szacunkowej lub granicznej w przypadkach, gdy z powodów technicznych nie można zastosować metody doświadczalnej.

METODA SZACOWANIA

Ciśnienie pary substancji ciekłych i stałych można oszacować przy użyciu zmodyfikowanej korelacji Watsona (a). Jedyną wymaganą daną doświadczalną jest normalna temperatura wrzenia. Metoda ta ma zastosowanie w przedziale ciśnienia od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Szczegółowe informacje na temat tej metody podano w publikacji „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Zob. także: OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

PROCEDURA OBLICZENIOWA

Ciśnienie pary oblicza się następująco:

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

gdzie:

- T = rozpatrywana temperatura,
- T_b = normalna temperatura wrzenia,
- P_{vp} = ciśnienie pary w temperaturze T,
- ΔH_{vb} = ciepło parowania,
- ΔZ_b = współczynnik ściśliwości (oszacowany na 0,97),
- m = współczynnik empiryczny zależny od stanu fizycznego w rozpatrywanej temperaturze.

Dalej

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

gdzie K_f jest współczynnikiem empirycznym uwzględniającym polarność substancji. Dla szeregu typów związków współczynniki K_f podano w opracowaniu (b).

Dość często dostępne są dane, w których podana jest temperatura wrzenia przy obniżonym ciśnieniu. W takim przypadku ciśnienie pary oblicza się następująco:

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

gdzie T_1 jest temperaturą wrzenia przy obniżonym ciśnieniu P_1 .

SPRAWOZDANIE

W przypadku użycia metody szacowania sprawozdanie powinno zawierać wyczerpującą dokumentację obliczeń.

LITERATURA

- (a) Watson, K.M. (1943). *Ind. Eng. Chem*, 35, 398.
 - (b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill.
 - (c) OECD Environmental Monograph No. 67. *Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment* (1993).
-

ZAŁĄCZNIK II

A.22. WAŻONA DŁUGOŚCIĄ ŚREDNIA GEOMETRYCZNA ŚREDNICA WŁÓKIEN

1. METODA

1.1. WSTĘP

W opisie metody przedstawiono procedurę stosowaną do określenia ważonej długością średniej geometrycznej średnicy włókna (LWGMD) sztucznych włókien mineralnych luzem (MMMF). Ponieważ LWGMD populacji z prawdopodobieństwem 95 % znajdzie się między dwoma 95 % poziomami ufności ($LWGMD \pm$ dwa błędy standardowe) próby, wartością przedstawianą (wartością testową) będzie niższy przedział ufności próby (tj. $LWGMD - 2$ błędy standardowe). Metoda opiera się na aktualizowanej (czerwiec 1994) wstępnej wersji procedury HSE w przemyśle, uzgodnionej na spotkaniu ECFIA z HSE w Chester 26.09.1993 i opracowanej dla i na podstawie wyników drugiego testu międzylaboratoryjnego (1, 2). Ta metoda pomiaru może być stosowana do charakteryzowania średnicy włókien substancji luzem lub produktów zawierających MMMF, w tym ogniotrwałych włókien ceramicznych (RCF), sztucznych włókien szklanych (MMVF), włókien krystalicznych i polikrystalicznych.

Ważenie długością jest sposobem kompensowania efektu rozkładu średnic włókien, spowodowanego łamaniem się długich włókien w czasie pobierania próbek lub manipulowania materiałem. Do pomiaru rozkładu średnic MMMF stosuje się parametry statystyczne (średnia geometryczna), ponieważ średnice te mają zwykle rozkład wielkości zbliżony do lognormalnego.

Pomiar długości, a także średnicy, jest żmudny i czasochłonny, ale jeśli mierzone są tylko te włókna, które dotykają nieskończenie cienkiej linii w polu widzenia skaningowego mikroskopu elektronowego, to prawdopodobieństwo wybrania danego włókna jest proporcjonalne do jego długości. Ponieważ w obliczeniach ważonych długością uwzględniona jest długość, to jedyną wymaganą miarą jest średnica i LWGMD-2SE może być obliczana, jak opisano.

1.2. DEFINICJE

Cząstka: obiekt o stosunku długości do szerokości mniejszym niż 3:1.

Włókno: obiekt o stosunku długości do szerokości (wydłużenie) co najmniej 3:1.

1.3. ZAKRES I OGRANICZENIA

Metoda ta została opracowana w celu obserwacji rozkładu średnic, które charakteryzują się medianą od 0,5 μm do 6 μm . Większe średnice mogą być mierzone przy zastosowaniu mniejszego powiększenia mikroskopu, ale zastosowanie metody jest coraz bardziej ograniczone w miarę zmniejszania się włókien i dla mediany średnic poniżej 0,5 μm zaleca się stosowanie TEM (transmisyjny mikroskop elektronowy).

1.4. ZASADA METODY TESTOWEJ

Z włókniny lub włókien luzem pobierana jest pewna liczba reprezentatywnych próbek rdzeniowych. W procedurze kruszenia zmniejsza się długość włókien luzem i reprezentatywna podpróbka jest rozprowadzana w wodzie. Alikwoty są ekstrahowane i filtrowane przez filtry poliwęglanowe o otworach 0,2 μm i przygotowywane do badań przy zastosowaniu techniki skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Średnice włókien są mierzone przy powiększeniu $\times 10\,000$ lub większym ⁽¹⁾ przy zastosowaniu metody przecięcia linii, aby otrzymać nieprzekłamaną szacunkową wielkość średnicy. Obliczany jest niższy 95 % przedział ufności (na podstawie testu jednostronnego) w celu uzyskania szacunkowej najniższej wartości średniej geometrycznej średnicy włókien materiału.

(¹) Ta skala powiększenia jest wskazana dla włókien 3 μm , dla włókien 6 μm właściwsze może być powiększenie $\times 5\,000$.

1.5. OPIS METODY TESTOWEJ

1.5.1. **Bezpieczeństwo/środki ostrożności**

Należy ograniczać kontakt z zawieszonymi w powietrzu włóknami i przy manipulowaniu suchymi włóknami należy stosować wyciąg lub komorę rękawicową. Należy przeprowadzać okresowy monitoring ekspozycji w celu określenia skuteczności zastosowanych metod zabezpieczenia. Przy pracy z MMMF należy używać rękawic jednorazowych, aby zmniejszyć podrażnienie skóry i zapobiec skażeniu krzyżowemu.

1.5.2. **Aparatura/sprzęt**

- Prasa (o nacisku co najmniej 10 MPa) i formy,
- poliwęglanowy filtr o porach kapilarnych średnicy 0,2 µm (średnica filtra 25 mm),
- celulozowy filtr membranowy stosowany jako filtr wstępny,
- szklana aparatura filtracyjna (lub jednorazowe systemy filtracyjne) do umocowania filtrów (np. szklany zestaw do mikroanalizy Millipore, typ nr XX10 025 00),
- świeżo destylowana woda, która została przefiltrowana przez filtr o średnicy porów 0,2 µm w celu usunięcia mikroorganizmów,
- napyłarka do napyłania złotem lub złotem/palladem,
- skaningowy mikroskop elektronowy o rozdzielczości do 10 nm i mogący pracować przy powiększeniu × 10 000,
- dodatki: szpatułka, ostrza skalpeli typ 24, pincety, rurki SEM, klej węglowy lub węglowa taśma klejąca, srebro koloidalne,
- sonda ultradźwiękowa lub podręczna myjka ultradźwiękowa,
- urządzenie do pobierania próbek rdzeniowych lub korkociąg do pobierania próbek rdzeniowych z włókniny MMMF.

1.5.3. **Procedura testowa**1.5.3.1. *Pobieranie próbek*

W przypadku włókniny i płatów materiału do pobierania prób przekroju stosuje się 25 mm urządzenie do pobierania próbek rdzeniowych lub korkociąg. Próbki powinny być pobierane z miejsc rozmieszczonych równomiernie na całej szerokości włókniny, jeśli ma ona niewielką długość lub miejsc losowych w przypadku długich płatów włókniny. Te same urządzenia mogą być używane do pobierania losowych próbek z włókien luzem. Jeśli to możliwe należy pobierać sześć próbek, aby uwzględnić zróżnicowanie przestrzenne materiału luzem.

Sześć próbek rdzeniowych należy pokruszyć w formie o średnicy 50 mm, stosując nacisk 10 MPa. Materiał mieszany jest szpatułką i powtórnie prasowany przy zastosowaniu nacisku 10 MPa. Materiał następnie wyjmuje się z formy i umieszcza w szczelnej szklanej butelce.

1.5.3.2. *Przygotowanie próby*

Jeśli to konieczne, można usunąć organiczny środek wiążący przez umieszczenie włókien na około 1 godzinę w piecu o temperaturze 450 °C.

Próby podzielić przez stożkowanie i ćwiartkowanie (należy to zrobić w komorze odpylającej).

Szpatułką dodać niewielką ilość (< 0,5 g) próbki do 100 ml świeżo destylowanej wody, która została przefiltrowana przez filtr membranowy 0,2 µm (można użyć alternatywnych źródeł ultraczystej wody, jeśli wykazano, że są zadowalającej jakości). Rozprowadzić dokładnie sondą ultradźwiękową przy mocy roboczej 100 W, ustawionej tak, aby zachodziła kawitacja. (Jeśli nie ma sondy zastosować następującą metodę: wytrząsać wielokrotnie i odwrócić na 30 sekund; umieścić w myjce ultradźwiękowej na pięć minut; następnie wielokrotnie wytrząsać i odwrócić ponownie na 30 sekund).

Natychmiast po rozproszeniu włókien pobrać kilka alikwot (np. trzy alikwoty 3, 6 i 10 ml) przy użyciu szerokiej pipety (pojemności 2–5 ml).

Każdą alikwotę przefiltrować próżniowo przez 0,2 μm filtr poliwęglanowy z dodatkowym filtrem wstępnym MEC o średnicy porów 5 μm , stosując 25 mm szklany lejek z cylindrycznym zbiornikiem. Do lejka należy wlać 5 ml przefiltrowanej wody destylowanej, a alikwotę należy wolno pipetować do wody, przy czym jej końcówka powinna znajdować się poniżej menisku. Po pipetowaniu należy dokładnie spłukać pipetę i zbiorniczek, ponieważ cienkie włókna często zalegają na powierzchni.

Uważnie wyjąć filtr i przed umieszczeniem w naczyniu do suszenia oddzielić go od dodatkowego filtra.

Odcinając ćwiartkę lub połowę przekroju filtru przefiltrowanego osadu ostrzem skalpela typu 24, stosując ruch wahadłowy. Ostrożnie przymocować odcięty przekrój do stolika SEM, stosując klej węglowy lub węglową taśmę klejącą. Srebro koloidalne należy nałożyć przynajmniej w trzech miejscach, aby zapewnić lepszy kontakt elektryczny na krawędziach filtra i stolika. Po wyschnięciu kleju/srebra koloidalnego napylić ok. 50 nm warstwę złota lub złota/palladu na powierzchnię osadu.

1.5.3.3. Kalibracja i obsługa SEM

1.5.3.3.1. Kalibracja

Kalibracja SEM powinna być sprawdzana przynajmniej raz w tygodniu (najlepiej codziennie) przy użyciu certyfikowanej siatki kalibracyjnej. Kalibracja powinna być porównywana z certyfikowanym wzorcem i jeśli zmierzona wartość (SEM) nie mieści się w granicach $\pm 2\%$ wartości wzorcowej, należy przeprowadzić kalibrację SEM i powtórzyć kontrolę.

Mikroskop SEM powinien mieć rozdzielczość wystarczającą co najmniej do zidentyfikowania widzialnej średnicy 0,2 μm przy użyciu prawdziwego materiału próbki przy powiększeniu $\times 2\,000$.

1.5.3.3.2. Obsługa

SEM powinien działać przy powiększeniu 10 000 razy ⁽¹⁾ w warunkach, które zapewniają dobrą rozdzielczość, przy możliwej do przyjęcia jakości obrazu i przy niskiej prędkości skanowania, na przykład 5 sekund na obraz. Wprawdzie wymagania operacyjne mogą się różnić w przypadku poszczególnych SEM, ale generalnie, aby otrzymać najlepszą widzialność i rozdzielczość z materiałami o stosunkowo niskiej masie atomowej powinno się stosować napięcia przyspieszające 5–10 keV, przy stosunkowo małej średnicy plamki i niewielkiej odległości roboczej. Ponieważ przeprowadzane jest przesuwanie liniowe, należy zastosować pochylenie 0°, aby zminimalizować konieczność ponownego ustawienia ogniskowej lub, jeśli SEM wyposażony jest w stolik eucentryczny, należy zastosować eucentryczną odległość roboczą. Mniejsze powiększenia można stosować, jeśli materiał nie zawiera małych (pod względem średnicy) włókien i wszystkie średnice włókien są $> 5\ \mu\text{m}$.

1.5.3.4. Rozmiary

1.5.3.4.1. Badanie przy małym powiększeniu, aby ocenić próbkę

Najpierw należy obejrzeć próbkę przy małym powiększeniu, aby sprawdzić, czy występują skupienia dużych włókien i ocenić gęstość włókien. W przypadku nadmiernej grudkowatości zaleca się przygotowanie nowej próbki.

Aby zapewnić statystyczną dokładność konieczne jest zmierzenie minimalnej liczby włókien, a wysoka gęstość włókien może zostać uznana za przydatną właściwość, ponieważ badanie pustych pól jest czasochłonne i niewiele wnosi do analizy. Jeśli jednak filtr jest przeładowany, dokonanie pomiaru wszystkich możliwych do zmierzenia włókien staje się trudne, a ponieważ małe włókna mogą być zasłaniane przez większe, można je przeoczyć.

Tendencja do popełniania błędów przeszacowania LWGMD może wynikać z gęstości włókien powyżej 150 włókien na milimetr liniowego przesunięcia. Z drugiej strony niskie zagęszczenie włókien wydłuża czas analizy i często przygotowanie próbki z zagęszczeniem włókien bliższym optimum jest bardziej ekonomiczne niż poleganie na zliczeniach na filtrach o niskim zagęszczeniu. Przy optymalnym zagęszczeniu, na pole widzenia przy powiększeniu 5 000 razy powinno przypadać średnio jedno lub dwa policzalne włókna. Optymalne zagęszczenie zależy jednak od wielkości (średnicy) włókien, tak więc konieczne jest, aby operator korzystał ze specjalistycznych ocen, które pozwolą mu stwierdzić czy zagęszczenie włókien jest bliskie optymalnemu czy nie.

(1) W przypadku włókien 3 μm zob. poprzedni przypis.

1.5.3.4.2. Ważenie długością średnic włókien

Liczone są tylko te włókna, które dotykają (lub przecinają) (nieskończenie) cienkiej linii na ekranie SEM. Z tego powodu przez środek ekranu przebiega pozioma (lub pionowa) linia.

Alternatywną możliwością jest umieszczenie jednego punktu na środku ekranu i stałe skanowanie przez filtr w jednym kierunku. Średnica każdego włókna o współczynniku smukłości większym niż 3:1 i dotykającym tego punktu lub go przecinającym jest mierzona, a wyniki są rejestrowane.

1.5.3.4.3. Wyznaczanie wielkości włókien

Zaleca się, aby zmierzyć co najmniej 300 włókien. Każde włókno mierzone jest tylko raz w punkcie przecięcia z linią lub punktem narysowanym na obrazie (lub blisko punktu przecięcia, jeśli brzegi włókna są niewyraźne). Jeśli napotyka się włókna o niejednorodnym przekroju, należy stosować miarę mówiącą o średniej średnicy włókna. Należy zachować ostrożność przy wyznaczaniu krawędzi i mierzeniu najmniejszej odległości między brzegami włókien. Pomiaru mogą być przeprowadzane *on-line* lub *off-line* na zapisanych obrazach lub fotografiach. Zaleca się stosowanie półautomatycznych systemów pomiarów obrazu, które ładują dane bezpośrednio do arkusza kalkulacyjnego, ponieważ oszczędzają one czas, eliminują błędy transkrypcji, a obliczenia mogą być zautomatyzowane.

Końce długich włókien powinny być sprawdzane przy małych powiększeniach, aby upewnić się, że włókna te nie zwijają się z powrotem, nie wracają do pola widzenia i że są mierzone tylko raz.

2. DANE

2.1. POSTĘPOWANIE Z WYNIKAMI

Zwykle średnice włókien nie odbiegają od rozkładu normalnego. Dokonując jednak przekształcenia logarytmicznego, możliwe jest uzyskanie rozkładu, który w przybliżeniu odpowiada normalnemu.

Obliczyć średnią arytmetyczną (średnia $\ln D$) i odchylenie standardowe ($SD_{\ln D}$) wartości logarytmu logarytmu naturalnego ($\ln D$) średnic n włókien (D).

$$\text{średnia } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{średnia } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Odchylenie standardowe dzieli się przez pierwiastek kwadratowy liczby pomiarów (n) w celu obliczenia błędu standardowego ($SE_{\ln D}$).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odjąć dwa błędy standardowe od średniej i obliczyć wykładnik dla tej wartości (średnia minus dwa błędy standardowe), aby otrzymać średnią geometryczną minus dwa błędy standardowe.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{średnia } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

3. **RAPORTOWANIE**

RAPORT Z TESTU

Raport z przeprowadzonego testu musi zawierać przynajmniej następujące informacje:

- wartość LWGMD-2SE,
- wszelkie odstępstwa od procedury, a w szczególności te, które mogą mieć wpływ na precyzję lub dokładność wyników, z odpowiednimi wyjaśnieniami.

4. **LITERATURA**

- (1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.
 - (2) G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.
-

ZAŁĄCZNIK III

B.46. DZIAŁANIE DRAŻNIĄCE NA SKÓRĘ IN VITRO: BADANIE NA MODELU ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Działanie drażniące na skórę oznacza powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji na okres do 4 godzin [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)](1). Niniejsza metoda badania obejmuje procedurę *in vitro*, która — zależnie od potrzeb informacyjnych — może umożliwić ustalenie drażliwości substancji dla skóry na podstawie samodzielnego badania zastępczego w ramach strategii badawczej, zgodnie z podejściem uwzględniającym wartość naukową danych (2).

Ocena działania drażniącego na skórę obejmowała na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych (zob. metoda B.4)(3). Z uwagi na konieczność zapewnienia dobrostanu zwierząt opracowano metodę B.4, która pozwala na ustalenie działania żrącego/drażniącego na skórę dzięki zastosowaniu strategii badań sekwencyjnych, przy użyciu zwalidowanych metod *in vitro* i *ex vivo*, co pozwala na uniknięcie zadawania bólu zwierzętom i powodowania ich cierpienia. Do części dotyczącej badań działania żrącego w ramach strategii badań sekwencyjnych B.4 przydatne są trzy zwalidowane metody badania (wytyczne do badań) *in vitro* B.40, B.40bis i TG 435 (4, 5, 6).

Niniejsza metoda badania opiera się na wykorzystaniu modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka, które pod względem ogólnej struktury (zastosowanie keratynocytów naskórka pochodzenia ludzkiego jako źródła komórek, reprezentatywna tkanka i cytoarchitektura) imitują ściśle biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych części ludzkiej skóry, tj. naskórka. Procedura opisana w niniejszej metodzie badania pozwala na identyfikację zagrożeń powodowanych przez substancje drażniące zgodnie z kategorią 2 GHS ONZ. Niniejsza metoda badania obejmuje również zestaw norm efektywności do oceny podobnych i zmodyfikowanych metod badania z wykorzystaniem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (7).

Przeprowadzono badania wstępne, optymalizacyjne i walidacyjne dwóch metod badania *in vitro* (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), dostępnych w handlu pod nazwami EpiSkin™ i EpiDerm™, wykorzystujących modele zrekonstruowanego ludzkiego naskórka. Badania te przeprowadzono z udziałem substancji należących do kategorii R38. Niektóre aspekty ponownych obliczeń na potrzeby Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów znajdują się w pozycji 25 Literatury. Metody o porównywalnej wydajności z EpiDerm™ (zwalidowana metoda referencyjna 1), są zalecane jako samodzielne metody badania zastępujące badanie *in vivo* na królikach kwalifikujące do kategorii 2 według GHS, substancje drażniące. EpiDerm™ (zwalidowana metoda referencyjna 2) zaleca się do stosowania jedynie jako przesiewową metodę badania lub w ramach strategii badań sekwencyjnych, zgodnie z podejściem uwzględniającym wartość naukową danych, w celu zaklasyfikowania do kategorii 2 według GHS, substancje drażniące. Zanim będzie możliwe wykorzystanie proponowanego badania działania drażniącego na skórę *in vitro* na modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka do celów regulacyjnych, należy ustalić jego wiarygodność, istotność (dokładność) i ograniczenia w zakresie dotyczącym jego proponowanego stosowania, aby zapewnić jego porównywalność ze zwalidowaną metodą referencyjną 1, zgodnie z normami efektywności określonymi w niniejszej metodzie badania (dodatek).

Dwie inne metody badania *in vitro* z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka zostały zwalidowane zgodnie z wymaganiami na podstawie niniejszej metody badania i dają podobne wyniki jak zwalidowana metoda referencyjna 1 (18). Są to zmodyfikowana metoda badania EpiDerm™ (zmodyfikowana metoda referencyjna 2) i metoda badania SkinEthic RHE™ (metoda naśladowcza 1).

1.2. DEFINICJE

W ramach niniejszej metody badania stosowane są następujące definicje:

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcie tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania.

Substancja do kontroli serii: substancja wzorcowa powodująca średnią reakcję tkankową pod względem żywotności komórek.

Żywotność komórek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości przyżyciowego barwnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy, błękit tiazolilowy), który, w zależności od mierzonego punktu końcowego i zastosowanego schematu badania, odpowiada całkowitej liczbie i/lub żywotności żywych komórek.

ET₅₀: czas ekspozycji potrzebny do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu markera w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC₅₀.

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: Odsetek wszystkich obecnych substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badania jako nieobecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich nieobecnych (nieaktywnych) substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badania jako obecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

Dawka nieograniczona: ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów): wprowadzony w UE na mocy rozporządzenia (WE) nr 1272/2008 system proponujący klasyfikację substancji i mieszanin według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawiający odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich działań niepożądanych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

IC₅₀: stężenie, w którym marker powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50 % (IC₅₀) po stałym czasie ekspozycji, zob. również ET₅₀.

Normy efektywności: normy oparte na zwalidowanej metodzie referencyjnej, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się I) istotne składowe metody badania; II) wykaz minimum substancji referencyjnych wybranych spośród substancji wykorzystywanych do wykazania dopuszczalnej efektywności zwalidowanej metody referencyjnej oraz III) oparte na wynikach uzyskanych w odniesieniu do zwalidowanej metody referencyjnej, porównywalne poziomy dokładności i wiarygodności, które powinna wykazać proponowana metoda badania w ocenie dokonywanej przy użyciu wykazu minimum substancji referencyjnych.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w czasie, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.

Czułość: odsetek wszystkich obecnych/aktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania.

Swoistość: odsetek wszystkich nieobecnych/nieaktywnych substancji prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania.

Działanie drażniące na skórę: powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji na okres do 4 godzin. Działanie drażniące na skórę jest powstającą miejscowo, nieimmunogenną reakcją, która pojawia się wkrótce po stymulacji (24). Jego główną cechą jest odwracalny proces obejmujący reakcje zapalne oraz większość charakterystycznych objawów klinicznych podrażnienia (rumień, obrzęk, świąd i ból) związanych z procesem zapalnym.

1.3. ZAKRES I OGRANICZENIA

Ograniczeniem badań z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka objętych niniejszą metodą badania jest to, że pozwalają one jedynie na zaklasyfikowanie substancji jako drażniących dla skóry według kategorii 2 GHS ONZ. Ponieważ nie umożliwiają one zaklasyfikowania substancji do opcjonalnej kategorii 3 zdefiniowanej w GHS ONZ, wszystkie pozostałe substancje nie będą sklasyfikowane (brak kategorii). Może zaistnieć konieczność weryfikacji niniejszej metody badania, w zależności od potrzeb regulacyjnych i ewentualnego uwzględnienia w przyszłości nowych punktów końcowych bądź też udoskonalen metody lub opracowania nowych badań naśladowczych.

Niniejsza metoda badania umożliwia identyfikację zagrożeń stwarzanych przez drażniące substancje jednoskładnikowe (19), jednak nie zapewnia wystarczających informacji na temat działania żrącego na skórę. Nie można badać gazów i aerozoli, a w badaniu walidacyjnym nie oceniano jeszcze mieszanin.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną nakłada się miejscowo na trójwymiarowy model zrekonstruowanego ludzkiego naskórka, składający się z prawidłowych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się ze zorganizowanych warstw: podstawnej, kolczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej zawierającej międzykomórkowe, blaszkowate warstwy lipidów ułożonych w struktury analogiczne do stwierdzonych *in vivo*.

Zasada badań z użyciem modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka opiera się na założeniu, że substancje drażniące wykazują zdolność do przenikania przez warstwę rogową na drodze dyfuzji i są cytotoksyczne dla komórek głębszych warstw. Żywotność komórek mierzy się na podstawie konwersji przez dehydrogenazę przyżyciowego barwnika MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer EINECS 206-069-5, numer CAS 298-93-1] w niebieską sól formazanową, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (20). Substancje drażniące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej określonych wartości progowych (tj. $\leq 50\%$ dla substancji drażniących kategorii 2 GHS ONZ). Substancje, które prowadzą do zachowania żywotności komórek powyżej określonego poziomu progowego, nie będą klasyfikowane (tj. $> 50\%$ — brak kategorii).

Systemy modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka mogą być stosowane do badania substancji stałych, płynnych, półstałych i wosków. Płyny mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne w wodzie lub nie. W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Ponieważ do badań walidacyjnych systemów modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka wykorzystano 58 starannie wybranych substancji chemicznych reprezentujących szeroki wachlarz ich klas, oczekuje się, że omawiane metody powinny zasadniczo być odpowiednie dla różnych klas substancji chemicznych (16). Badania walidacyjne objęły 13 substancji kategorii 2 GHS. Należy podkreślić, że badania walidacyjne nie objęły niektórych niekorodujących kwasów, zasad, soli i innych substancji nieorganicznych, oraz nie objęły, bądź objęły jedynie w ograniczonym stopniu niektóre znane klasy organicznych substancji drażniących takich jak wodorodnadtlenki, fenole oraz substancje powierzchniowo czynne.

1.5. WYKAZANIE EFEKTYWNOŚCI

Przed rozpoczęciem rutynowego stosowania zwalidowanej metody zgodnej z niniejszą metodą badania laboratoria mogą chcieć wykazać jej efektywność techniczną z wykorzystaniem dziesięciu substancji chemicznych zaleconych w tabeli 1. Zgodnie z niniejszą metodą badania, opcjonalna kategoria 3 GHS ONZ jest uznawana za brak kategorii. W przypadku nowych podobnych (naśladowczych) metod badania opracowanych na podstawie niniejszej metody badania, podobnych strukturalnie i funkcjonalnie do zwalidowanych metod referencyjnych, lub w przypadku modyfikacji zwalidowanych metod należy zastosować normy efektywności opisane w dodatku do niniejszej metody badania, aby wykazać porównywalną wiarygodność i dokładność nowej metody badania przed jej zastosowaniem do badań regulacyjnych.

Tabela 1

Substancje do oceny efektywności, które stanowią podgrupę referencyjnych substancji wymienionych w dodatku

Substancja	Numer CAS	Ocena <i>in vivo</i>	Stan fizyczny	Kategoria GHS
Kwas naftylooctowy	86-87-3	0	S	Brak kat.
Izopropanol	67-63-0	0,3	C	Brak kat.
Stearynian metylu	112-61-8	1	S	Brak kat.
Maślan heptylu	5870-93-9	1,7	C	Opcjonalna kat. 3
Salicylan heksylu	6259-76-3	2	C	Opcjonalna kat. 3
Aldehyd cyklamenu	103-95-7	2,3	C	Kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	C	Kat. 2
Metakrylan butylu	97-88-1	3	C	Kat. 2
1-metylo-3-fenylo-1-piperazyna	5271-27-2	3,3	S	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	4	C	Kat. 2

1.6. OPIS METODY

Poniżej przedstawiono opis składowych i procedur badania oceniającego działanie drażniące na skórę przy użyciu modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka. Model zrekonstruowanego ludzkiego naskórka może zostać utworzony lub przygotowany samodzielnie bądź też uzyskany na rynku (np. EpiSkin™, EpiDerm™ i SkinEthic RHE™). Standardowe protokoły metod badania z użyciem modeli EpiSkin™, EpiDerm™ i SkinEthic RHE™ można uzyskać na stronie internetowej [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>] (21, 22, 23). Badania należy wykonywać zgodnie z poniższymi zaleceniami:

1.6.1. Składowe modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka

1.6.1.1. Ogólne warunki modelu

Do tworzenia naskórka należy użyć prawidłowych ludzkich keratynocytów. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek naskórka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych markerów, np. soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym marker zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC_{50}) po ustalonym czasie ekspozycji, albo poprzez ustalenie czasu ekspozycji potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET_{50}) po zastosowaniu markera w określonym, stałym stężeniu. Właściwości izolacyjne modelu powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie ekspozycji skóry mogłoby być niewłaściwe. Model skóry nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmami ani grzybami.

1.6.1.2. Funkcjonalne warunki modelu

1.6.1.2.1. Żywotność

Zalecaną próbą ustalenia wielkości żywotności jest MTT (20). Gęstość optyczna (OD) ekstrahowanego (rozpuszczonego) barwnika z tkanki potraktowanej kontrolą negatywną (NC) powinna być co najmniej 20 razy większa niż OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji. Należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności) tkanki potraktowanej NC w okresie ekspozycji testowej.

1.6.1.2.2. Funkcja bariery

Warstwa rogowa i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie cytotoksycznych markerów, np. SDS lub markera Triton X-100, według oceny na podstawie IC_{50} lub ET_{50} .

1.6.1.2.3. Morfologia

Odpowiednio wykwalifikowany personel powinien przeprowadzić badanie histologiczne zrekonstruowanej skóry/zrekonstruowanego naskórka, z wykazaniem istnienia struktury przypominającej ludzką skórę/ludzki naskórek (w tym wielopoziomowej warstwy rogowej).

1.6.1.2.4. Odtwarzalność

Należy wykazać odtwarzalność w czasie wyników zastosowania metody wykorzystującej określony model, najlepiej z użyciem właściwej substancji (wzorcowej) do kontroli serii (zob. dodatek).

1.6.1.2.5. Kontrole jakości (QC) modelu

Każda seria stosowanego modelu naskórka powinna spełniać określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najistotniejsze są te dotyczące żywotności (pkt 1.6.1.2.1) i funkcji bariery (pkt 1.6.1.2.2). Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicą) IC_{50} lub ET_{50} powinien zostać ustalony przez dostawcę modelu skóry (lub badacza w przypadku stosowania modelu opracowanego wewnętrznie). Właściwości bariery cechujące tkanki powinny być sprawdzane przez laboratorium po otrzymaniu tkanek. Do wiarygodnego przewidywania skutków drażniących można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem zakwalifikowanych tkanek. Poniżej przedstawiono przykładowe zakresy dopuszczalności zwalidowanych metod referencyjnych.

Tabela 2

Przykłady kryteriów zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

	Dolna granica dopuszczalności	Średnia zakresu dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
Zwalidowana metoda referencyjna 1 (traktowanie SDS przez 18 godzin)	$IC_{50} = 1,0$ mg/ml	$IC_{50} = 2,32$ mg/ml	$IC_{50} = 3,0$ mg/ml
Zwalidowana metoda referencyjna 2 (1 % Triton X100)	$ET_{50} = 4,8$ h	$ET_{50} = 6,7$ h	$ET_{50} = 8,7$ h

1.6.1.3. *Nakładanie substancji badanej i kontrolnej*

Konieczne jest zastosowanie dostatecznej liczby powtórzeń poddawania tkanek działaniu badanej substancji i prób kontrolnych (co najmniej trzy powtórzenia na serię badań). W przypadku płynnych i stałych substancji należy nałożyć na skórę dostateczną ilość substancji badanej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię skóry, unikając jednak nakładania dawki nieograniczonej (zob. 1.2 Definicje), tj. należy użyć co najmniej 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ lub 25 mg/cm^2 . W przypadku substancji stałych przed ich nałożeniem należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną, aby zapewnić dobry kontakt ze skórą. W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Pod koniec okresu ekspozycji substancję badaną należy ostrożnie zmyć z powierzchni skóry buforem wodnym lub 0,9 % NaCl. Zależnie od stosowanego modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka okres ekspozycji może się wahać od 15 do 60 minut, a temperatura inkubacji może wynosić od 20 do 37 °C. Szczegółowe informacje określono w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących trzech omawianych metod (21, 22, 23).

W każdym badaniu należy stosować równocześnie kontrolę negatywną (NC) i pozytywną (PC), aby wykazać, że żywotność (NC), funkcja bariery i ostateczna czułość tkankowa (PC) są zawarte w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Jako substancji stanowiącej PC zaleca się użycie 5 % roztworu wodnego SDS. Zalecanymi substancjami stanowiącymi NC są woda lub sól fizjologiczna zbuforowana fosforanem (PBS).

1.6.1.4. *Pomiary żywotności komórek*

Najważniejszym elementem procedury badania jest to, że pomiarów żywotności nie wykonuje się natychmiast po ekspozycji na badane substancje, ale po dostatecznie długim okresie inkubacji tkanek przemitych po tej ekspozycji, w świeżym podłożu. Ten okres pozwala zarówno na ustąpienie słabo drażniących działań, jak i na pojawienie się wyraźnych działań cytotoksycznych. W trakcie fazy optymalizacji badania (9, 10, 11, 12, 13) okazało się, że optymalny jest okres 42 godzin inkubacji tkanek po ekspozycji, w związku z czym został on wykorzystany do walidacji referencyjnych metod badania.

Próba konwersji MTT jest zwalidowaną metodą ilościową, którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Próbkę skóry umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/ml) na 3 godziny. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanol, kwaśny izopropanol) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, w paśmie maksimum \pm 30 nm.

Właściwości optyczne substancji badanej lub jej działanie chemiczne na MTT mogą wpływać na próbę, powodując zafałszowanie oceny żywotności (ponieważ substancja badana może uniemożliwiać lub odwracać oraz powodować powstawanie barwy). Może tak się zdarzyć w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej ze skóry przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek. Jeśli substancja badana oddziałuje bezpośrednio na MTT, jest naturalnie barwna lub staje się barwna w trakcie oddziaływania na tkankę, należy zastosować dodatkowe kontrole w celu wykrycia i skorygowania wpływu substancji badanej na technikę pomiaru żywotności. Szczegółowy opis sprawdzenia, czy nie dochodzi do bezpośredniej redukcji MTT, zawarty jest w protokole metody badania dotyczącym zwalidowanych metod referencyjnych (21, 22, 23). Nieświasta barwa (NSC) związana z tymi oddziaływaniami nie powinna przekraczać 30 % NC (do korekcji). Jeśli $\text{NSC} > 30\%$, uznaje się, że badanie nie nadaje się do oceny badanej substancji.

1.6.1.5. *Kryteria dopuszczalności próby*

W przypadku każdej próby z użyciem zwalidowanych serii (zob. pkt 1.6.1.2.5), tkanki traktowane NC powinny wykazywać OD odpowiednią do jakości tkanek poddanych wszystkim etapom wszystkim procesom protokołu badania działania drażniącego. Wartości OD kontroli nie powinny być niższe niż dolne granice zdefiniowane na podstawie danych historycznych. Również tkanki traktowane PC, tj. 5 % wodnym roztworem SDS, powinny wykazywać czułość zachowaną przez tkanki i zdolność do reagowania na substancję drażniącą w warunkach każdej pojedynczej próby (np. żywotność $\leq 40\%$ w przypadku zwalidowanej metody referencyjnej 1 oraz $\leq 20\%$ w przypadku zwalidowanej metody referencyjnej 2). Należy zdefiniować powiązane i właściwe miary zmienności pomiędzy powtórzeniami tkankowymi (np. w przypadku stosowania odchyłek standardowych powinny być one $< 18\%$).

2. **DANE**

2.1. **DANE**

W przypadku każdej ekspozycji należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzeń eksperymentu, dane z poszczególnych, powtarzalnych prób (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej badanej substancji, łącznie z klasyfikacją). Dodatkowo należy przedstawić średnie \pm odchylenie standardowe z każdej próby. Powinny być przedstawione zaobserwowane interakcje z odczynnikami MTT i z barwnymi substancjami badanymi w odniesieniu do każdej badanej substancji.

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wartości OD uzyskane dla każdej próbki badanej można wykorzystać do obliczenia procentowej żywotności w porównaniu do NC, której żywotność ustala się na 100 %. Należy wyraźnie zdefiniować i udokumentować wartość odcięcia procentowej żywotności komórek, odróżniając drażniące substancje badane od niesklasyfikowanych substancji badanych, oraz procedury statystyczne stosowane do oceny wyników i identyfikacji substancji drażniących; należy również udowodnić, że są one właściwe. Poniżej podano wartości odcięcia do predykcji działania drażniącego, związane ze zwalidowanymi metodami referencyjnymi:

Substancję badaną uznaje się za drażniącą dla skóry zgodnie z kategorią 2 GHS ONZ:

- (i) jeśli żywotność tkanki po ekspozycji i następującej po niej inkubacji jest mniejsza lub równa (\leq) 50 %.

Substancję badaną uznaje się za niezakwalifikowaną do żadnej kategorii:

- (ii) jeśli żywotność tkanki po ekspozycji i następującej po niej inkubacji jest większa niż ($>$) 50 %.

3. SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania zawierać powinno następujące informacje:

Substancje badane i kontrolne:

- nazwy chemiczne, np. nazwa IUPAC lub CAS oraz numer CAS, jeśli jest znany,
- czystość i skład substancji (w procentach wagowych),
- właściwości fizykochemiczne istotne dla prowadzenia badania (np. stan fizyczny, stabilność i lotność, pH, rozpuszczalność w wodzie, jeśli jest znana),
- w stosownych przypadkach, obróbka substancji badanych/kontrolnych przed badaniem (np. ogrzanie, zmielenie),
- warunki przechowywania.

Uzasadnienie dla zastosowanego modelu skóry i protokołu.

Warunki badania:

- zastosowany system komórkowy,
- informacje na temat kalibracji urządzenia pomiarowego i pasma, które wykorzystano do pomiaru żywotności komórek (np. spektrofotometru),
- pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu skóry, z uwzględnieniem jego efektywności, w tym w szczególności następujące dane:
 - (i) żywotność;
 - (ii) funkcja bariery;
 - (iii) morfologia;
 - (iv) odtwarzalność i predykcyjność;
 - (v) kontrole jakości (QC) modelu,
- szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badania,
- zastosowane badane dawki, czas trwania ekspozycji i okresu inkubacji po ekspozycji,

- opis wszelkich modyfikacji procedury badania,
- odwołanie do danych historycznych modelu. Powinno to w szczególności obejmować:
 - (i) dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych;
 - (ii) dopuszczalność wartości kontroli pozytywnych i negatywnych, z określeniem pozytywnych i negatywnych średnich oraz zakresów kontroli,
- opis stosowanych kryteriów oceny, z uzasadnieniem wyboru punktu(-ów) odcięcia w modelu predykcyjnym.

Wyniki:

- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych próbek,
- opis innych zaobserwowanych skutków.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. LITERATURA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2007). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa 2007. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.
- (2) REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Dostępne na stronie internetowej: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649.
- (3) Test Method B.4. ACUTE TOXICITY; DERMAL IRRITATION/CORROSION.
- (4) Test Method B.40. *IN VITRO* SKIN CORROSION: TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST TER.
- (5) Test Method B.40 BIS. *IN VITRO* SKIN CORROSION: HUMAN SKIN MODEL TEST.
- (6) OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Przyjęte 19 lipca 2006 r. Dostępne na stronie internetowej: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.
- (7) ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Dostępne pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (8) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57–93.
- (9) Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 16, 765–770.
- (10) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, 107–114.
- (11) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests — An Assessment of the Performance of the Optimised Test. *ATLA* 33, 351–367.
- (12) Cotovio, J., Grandidier, M.–H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* 33, 329–249.

- (13) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30, 109–129.
 - (14) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandıárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.
 - (15) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 135 s. + załączniki. Dostępne pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
 - (16) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.
 - (17) J. Cotovio, M.–H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonnaud, J. Leclaire (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol. 14, 351–358.
 - (18) ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays z dnia 5 listopada 2008 r.
 - (19) WE (2006). Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 396 z 30.12.2006, s. 1. OPOCE, Luksemburg.
 - (20) Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
 - (21) EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test — 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Dostępne pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
 - (22) EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Dostępne pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
 - (23) SkinEthic RHE™ SOP. Tekst będzie dostępny pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
 - (24) Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. *Practical Contact Dermatitis* Mc Graw-Hill New York, s. 7–18.
 - (25) Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for *in vitro* skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, 13 listopada 2008 r.
-

Dodatek

Ocena charakterystyki efektywności proponowanych modeli in vitro zrekonstruowanego ludzkiego naskórka do badania działania drażniącego na skórę

WPROWADZENIE

Procedury proponowane do stosowania zgodnie z niniejszą metodą badania należy ocenić w celu ustalenia ich wiarygodności i dokładności, przy użyciu substancji reprezentujących pełny zakres wskaźników podrażnienia wg Draize'a. W ocenie z użyciem 20 zalecanych referencyjnych substancji (tabela 2) proponowana procedura powinna mieć wartość wiarygodności i dokładności porównywalną do wykazywanych przez zwalidowaną metodę referencyjną 1 (tabela 3) (1). Normy dokładności i wiarygodności, które powinny zostać osiągnięte, zostały przedstawione poniżej w pkt II i III. Uwzględniono tu substancje niesklasyfikowane i sklasyfikowane (według kategorii 2 GHS ONZ), reprezentujące istotne klasy substancji chemicznych, tak aby wiarygodność i wydajność (czułość, swoistość, odsetki wyników fałszywie ujemnych, odsetki wyników fałszywie dodatnich i dokładność) proponowanej metody badania można było porównać do tych cechujących zwalidowaną metodę referencyjną 1. Przed zastosowaniem metody badania do badań nowych substancji należy określić jej wiarygodność, a także zdolność do prawidłowej identyfikacji substancji drażniących należących do kategorii 2 GHS ONZ.

NORMY EFEKTYWNOŚCI

Normy efektywności obejmują następujące trzy elementy: I) istotne składowe metody badania, II) referencyjne substancje oraz III) zdefiniowane wartości dokładności i wiarygodności (2). Te normy efektywności są oparte na normach efektywności określonych po zakończeniu badania walidacyjnego ECVAM dotyczącego oceny działania drażniącego na skórę (3).

I) **Istotne składowe metody badania***Ogólne warunki modelu*

Do tworzenia naskórka należy użyć prawidłowych ludzkich keratynocytów. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek naskórka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych markerów, np. soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym marker zmniejsza żywotność tkanek o 50 % (IC₅₀) po ustalonym czasie ekspozycji, albo poprzez ustalenie czasu ekspozycji potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % (ET₅₀) po zastosowaniu markera w określonym, stałym stężeniu. Właściwości izolacyjne modelu powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie ekspozycji skóry mogłoby być niewłaściwe. Model skóry nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmami ani grzybami.

*Funkcjonalne warunki modelu**Żywotność*

Zalecaną próbą ustalenia wielkości żywotności jest MTT (4). Gęstość optyczna OD ekstrahowanego (rozpuszczonego) barwnika z tkanki potraktowanej NC powinna być co najmniej 20 razy większa niż OD samego rozpuszczalnika do ekstrakcji. Należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności) tkanki potraktowanej NC w okresie ekspozycji testowej.

Funkcja bariery

Warstwa rogowa i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie cytotoksycznych markerów, np. SDS lub markera Triton X-100, według oceny na podstawie IC₅₀ lub ET₅₀.

Morfologia

Odpowiednio wykwalifikowany personel powinien przeprowadzić badanie histologiczne zrekonstruowanej skóry/zrekonstruowanego naskórka, z wykazaniem istnienia struktury przypominającej ludzką skórę/ludzki naskórek (w tym wielopoziomowej warstwy rogowej).

Odtwarzalność

Należy wykazać odtwarzalność w czasie wyników zastosowania metody wykorzystującej określony model, najlepiej z użyciem właściwej substancji (wzorcowej) do kontroli serii (zob. definicje w sekcji 1.2).

Kontrole jakości (QC) modelu

Każda seria stosowanego modelu naskórka powinna spełniać określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których najistotniejsze są te dotyczące *żywności* i *funkcji bariery*. Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicą) IC_{50} lub ET_{50} powinien zostać ustalony przez dostawcę modelu skóry (lub badacza w przypadku stosowania modelu opracowanego wewnętrznie). Właściwości bariery cechujące tkanki powinny być sprawdzane przez laboratorium po otrzymaniu tkanek. Do wiarygodnego przewidywania skutków drażniących można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem zakwalifikowanych tkanek. Poniżej przedstawiono przykładowe zakresy dopuszczalności zwalidowanych metod referencyjnych.

Tabela 1

Przykłady kryteriów zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

	Dolna granica dopuszczalności	Średnia zakresu dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
Zwalidowana metoda referencyjna 1 (traktowanie SDS przez 18 godzin)	$IC_{50} = 1,0$ mg/ml	$IC_{50} = 2,32$ mg/ml	$IC_{50} = 3,0$ mg/ml
Zwalidowana metoda referencyjna 2 (1 % Triton X100)	$ET_{50} = 4,8$ h	$ET_{50} = 6,7$ h	$ET_{50} = 8,7$ h

II) Referencyjne substancje

Referencyjne substancje są wykorzystywane do ustalenia, czy wiarygodność i dokładność proponowanej nowej metody badania *in vitro* zrekonstruowanego ludzkiego naskórka, o udowodnionym dostatecznym podobieństwie strukturalnym i funkcjonalnym do zwalidowanych metod referencyjnych lub stanowiącej niewielką modyfikację zwalidowanej metody referencyjnej, wskazują na porównywalną efektywność tej metody z zatwierdzoną metodą referencyjną 1 (1). Do 20 referencyjnych substancji wymienionych w tabeli 2 należą substancje reprezentujące różne istotne klasy chemiczne, jak również substancje z kategorii 2 GHS ONZ. Wymienione substancje obejmują 10 substancji kategorii 2 GHS ONZ, 3 substancje opcjonalnej kategorii 3 GHS ONZ i 7 niesklasyfikowanych substancji. Zgodnie z niniejszą metodą badania opcjonalna kategoria 3 jest uznawana za brak kategorii. Te referencyjne substancje odpowiadają minimalnej liczbie substancji, które należy wykorzystać do oceny dokładności i wiarygodności proponowanej metody badania działania drażniącego na skórę z użyciem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka. W sytuacjach, w których wymieniona substancja nie jest dostępna, można wykorzystać inne substancje, w odniesieniu do których są dostępne właściwe dane referencyjne z badań *in vivo*. W razie potrzeby wykaz minimum substancji referencyjnych można uzupełnić o dodatkowe substancje, reprezentujące inne klasy chemiczne, w odniesieniu do których są dostępne dostateczne dane referencyjne z badań *in vivo*, aby dodatkowo ocenić dokładność proponowanej metody badania.

Tabela 2

Referencyjne substancje wykorzystywane do ustalenia dokładności i wiarygodności modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka do badań działania drażniącego na skórę

Substancja (*)	Nr CAS	Nr EINECS	Stan fizyczny	Ocena <i>in vivo</i>	Kat. GHS <i>in vitro</i>	Kat. GHS <i>in vivo</i>
1-bromo-4-chlorobutan	6940-78-9	230-089-3	C	0	Kat. 2	Brak kat.
Ftalan dietylu	84-66-2	201-550-6	C	0	Brak kat.	Brak kat.
Kwas naftylooctowy	86-87-3	201-705-8	S	0	Brak kat.	Brak kat.
2-propenylo fenoksyoctan	7493-74-5	231-335-2	C	0,3	Brak kat.	Brak kat.
Izopropanol	67-63-0	200-661-7	C	0,3	Brak kat.	Brak kat.
Aldehyd 4-metylo-tio-benzoowy	3446-89-7	222-365-7	C	1	Kat. 2	Brak kat.
Stearynian metylu	112-61-8	203-990-4	S	1	Brak kat.	Brak kat.

Substancja (*)	Nr CAS	Nr EINECS	Stan fizyczny	Ocena <i>in vivo</i>	Kat. GHS <i>in vitro</i>	Kat. GHS <i>in vivo</i>
Maślan heptylu	5870-93-9	227-526-5	C	1,7	Brak kat.	Opcjonalna kat. 3
Salicylan heksylu	6259-76-3	228-408-6	C	2	Brak kat.	Opcjonalna kat. 3
Fosforan triizobutyłu	126-71-6	204-798-3	C	2	Kat. 2	Opcjonalna kat. 3
1-dekanol	112-30-1	203-956-9	C	2,3	Kat. 2	Kat. 2
Aldehyd cyklamenu	103-95-7	203-161-7	C	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	203-850-2	C	2,7	Kat. 2	Kat. 2
Chlorowodorek 2-chlorometylo-3,5-dimetylo-4-metoksyperydyny	86604-75-3	434-680-9	S	2,7	Kat. 2	Kat. 2
a-terpineol	98-55-5	202-680-6	C	2,7	Kat. 2	Kat. 2
Disiarczek di-n-propylu	629-19-6	211-079-8	C	3	Brak kat.	Kat. 2
Metakrylan butylu	97-88-1	202-615-1	C	3	Kat. 2	Kat. 2
Benzenotiol, 5-(1,1-dimetyloetylo)-2-metylu	7340-90-1	438-520-9	C	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metylo-3-fenyl-1-piperazyna	5271-27-2	431-180-2	S	3,3	Kat. 2	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	203-898-4	C	4	Kat. 2	Kat. 2

(*) 20 referencyjnych substancji stanowi reprezentatywny wybór spośród 58 substancji, które zostały pierwotnie użyte do zwalidowania metody referencyjnej 1 (EpiSkin™). Dostępny jest pełny wykaz substancji badanych i kryteriów ich wyboru (5).

Substancje wymienione w tabeli 2 stanowią reprezentatywny wybór spośród 58 substancji użytych w międzynarodowym badaniu walidacyjnym ECVAM dotyczącym oceny działania drażniącego na skórę (1). Ich wyboru dokonano na podstawie następujących kryteriów:

- wymienione substancje są dostępne w handlu,
- są reprezentatywne dla pełnego zakresu wskaźników podrażnienia wg Draize'a (od niedrażniących do silnie drażniących),
- mają określoną budowę chemiczną,
- są reprezentatywne dla odtwarzalności i zdolności predykcyjnej zwalidowanej metody, ustalonych w badaniu walidacyjnym wykonanym przez ECVAM,
- są reprezentatywne dla funkcjonalności chemicznej wykorzystywanej w procesie walidacji,
- nie wykazują bardzo wysokiego toksyczności (np. nie są rakotwórcze ani toksyczne dla układu rozrodczego) i nie wiążą się z nadmiernymi kosztami usuwania pozostałości.

III) Zdefiniowane wartości dokładności i wiarygodności

Wydajność (czułość, swoistość, odsetek wyników fałszywie ujemnych, odsetek wyników fałszywie dodatnich i dokładność) proponowanej metody badania powinna być porównywalna z odpowiednimi wartościami w przypadku zwalidowanej metody referencyjnej 1 (tabela 3), tj. czułość powinna być większa lub równa (\geq) 80 %, swoistość powinna być większa lub równa (\geq) 70 %, a dokładność powinna być większa lub równa (\geq) 75 %. Wydajność należy obliczyć z uwzględnieniem wszystkich uzyskanych klasyfikacji 20 substancji w uczestniczących laboratoriach. Klasyfikację każdej substancji w każdym laboratorium należy uzyskać na podstawie średniej wartości żywotności w trakcie wykonanych poszczególnych serii badań (minimum trzy ważne serie).

Tabela 3

Wydajność zwalidowanej metody referencyjnej 1 ⁽¹⁾

Metoda badania	Liczba substancji	Czułość	Swoistość	Odsetek wyników fałszywie ujemnych	Odsetek wyników fałszywie dodatnich	Dokładność
Zwalidowana metoda referencyjna 1 ⁽¹⁾	58	87,2 % ⁽²⁾	71,1 % ⁽³⁾	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Zwalidowana metoda referencyjna 1 ⁽¹⁾	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

⁽¹⁾ EpiSkin™.

⁽²⁾ Badanie z uwzględnieniem 13 substancji drażniących kategorii 2 GHS.

⁽³⁾ Badanie z uwzględnieniem 45 substancji drażniących kategorii 3 GHS lub substancji niesklasyfikowanych.

Wiarygodność proponowanej metody badania powinna być porównywalna z wiarygodnością zwalidowanych metod referencyjnych.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

Ocena odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej powinna wykazywać zgodność klasyfikacji (kategoria 2/brak kategorii) uzyskanej w różnych, niezależnych seriach badań 20 referencyjnych substancji w pojedynczym laboratorium większą lub równą (\geq) 90 %.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna

Ocena odtwarzalności międzylaboratoryjnej nie jest niezbędna, jeśli proponowana metoda badania ma być stosowana tylko w jednym laboratorium. Aby można było przenosić metody pomiędzy laboratoriami, zgodność klasyfikacji (kategoria 2/brak kategorii) uzyskanej w różnych, niezależnych seriach badań 20 referencyjnych substancji pomiędzy, najkorzystniej, minimalnie trzema laboratoriami powinna być większa lub równa (\geq) 80 %.

LITERATURA

- (1) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.
- (2) OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paryż.
- (3) ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Dostępne pod poleceniem Download Study Documents, na stronie internetowej <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>. Strona ostatnio sprawdzona w dniu 27.10.2008 r.
- (4) Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63.
- (5) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.

⁽¹⁾ W tabeli 3 podano wydajność określającą zdolność zwalidowanej metody referencyjnej 1 do prawidłowego zidentyfikowania substancji drażniących (kategoria 2 GHS ONZ) i niesklasyfikowanych substancji (brak kategorii, w tym opcjonalna kategoria 3) odpowiednio w odniesieniu do 58 i 20 referencyjnych substancji (tabela 2).

ZAŁĄCZNIK IV

C.3. BADANIE INHIBICJI WZROSTU SŁODKOWODNYCH GLONÓW I CYJANOBAKTERII

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. WSTĘP

Metody badawcze są okresowo przeglądane i aktualizowane w świetle postępu naukowego. Metoda badawcza C.3 wymagała korekty, tak by objąć dodatkowe gatunki i spełnić wymagania w zakresie oceny zagrożenia oraz klasyfikacji substancji chemicznych. Korekty dokonano na podstawie szerokich doświadczeń praktycznych, postępu naukowego w dziedzinie badań nad toksycznością glonów oraz rozległego zastosowania regulacyjnego, które nastąpiło od czasu pierwotnego przyjęcia.

1.2. DEFINICJE

Do celów niniejszej metody użyto następujących definicji i skrótów:

Biomasa: jest to ciężar suchej materii żywej obecnej w populacji, wyrażony na objętość; np. mg glonów/litr badanego roztworu. Zwykle „biomasę” określa się w postaci masy, lecz w niniejszym badaniu słowo to użyte jest w odniesieniu do masy przypadającej na objętość. Ponadto w niniejszym badaniu zwykle mierzy się również surogaty biomasy, takie jak liczba komórek, fluorescencja, itp. i przez to określenie „biomasa” odnosi się także do tych surogatowych miar.

Współczynnik zmienności: jest bezwymiarową miarą zmienności parametru, określoną jako stosunek odchylenia standardowego do średniej. Może on również być wyrażony jako wartość procentowa. Średni współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu w replikatowych kulturach kontrolnych należy obliczyć w następujący sposób:

1. Obliczyć % CV (współczynnik zmienności) średniej właściwej szybkości wzrostu z szybkości wzrostu dla odnośnego replikatu.
2. Obliczyć wartość średnią ze wszystkich wartości obliczonych w punkcie 1, otrzymując średni współczynnik zmienności właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych dni/odcinków w replikatowych kulturach kontrolnych.

EC_x: jest stężeniem substancji testowej rozpuszczonej w pożywce, powodującym zmniejszenie wzrostu badanego organizmu o x % (np. 50 %) w danym okresie ekspozycji (który należy wyraźnie podać, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby w sposób jednoznaczny oznaczyć wartość EC otrzymaną z szybkości wzrostu lub z uzysku, używa się symboli, odpowiednio, „E_rC” i „E_yC”.

Pożywka wzrostowa: jest to kompletne syntetyczne podłoże hodowlane, w którym wzrastają glony, gdy są wystawione na działanie substancji testowej. Substancja testowa zwykle jest rozpuszczona w pożywce.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu): jest to logarytmiczny wzrost biomasy w ciągu okresu ekspozycji.

Najmniejszy obserwowany poziom stężenia (LOEC): jest to najniższe badane stężenie, przy którym zostaje zaobserwowane, że substancja ma statystycznie istotny redukujący wpływ na wzrost (przy $p < 0,05$) w porównaniu do kultury kontrolnej, w danym okresie ekspozycji. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy wpływ równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. Gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy podać pełne wyjaśnienie, w jaki sposób LOEC (a stąd NOEC) zostało wybrane.

Nieobserwowany wpływ stężenia (NOEC): jest to stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna odpowiedź: jest to zmienna dla oszacowania toksyczności uzyskana z dowolnych zmierzonych parametrów opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody szybkości wzrostu i uzysk są zmiennymi odpowiedzi uzyskanymi z pomiaru biomasy bezpośrednio lub pomiaru dowolnego ze wspomnianych surogatów.

Właściwa szybkość wzrostu: jest to zmienna odpowiedzi określona jako iloraz różnicy logarytmów naturalnych parametru obserwacji (w niniejszej metodzie badawczej — biomasy) przez odpowiedni okres.

Uzysk: jest to wartość zmiennej pomiarowej na końcu okresu ekspozycji minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu ekspozycji, wyrażająca przyrost biomasy w ciągu badania.

1.3. STOSOWALNOŚĆ BADANIA

Niniejszą metodę badawczą najłatwiej stosuje się do substancji rozpuszczalnych w wodzie, które — w warunkach badania — prawdopodobnie pozostaną w wodzie. Dla badania substancji lotnych, silnie adsorbujących, zabarwionych lub mających niską rozpuszczalność w wodzie, bądź substancji, które mogą wpływać na dostępność składników pokarmowych lub minerałów w pożywce, mogą być wymagane pewne modyfikacje opisywanej procedury (np. układ zamknięty, specjalne przygotowanie naczyń testowych). Wskazówki dotyczące niektórych stosownych modyfikacji podano w (2), (3) i (4).

1.4. ZASADA BADANIA

Celem niniejszego badania jest określenie wpływu danej substancji na wzrost słodkowodnych mikroglonów i/lub cyanobakterii. Wykładniczo wzrastające badane organizmy wystawia się na działanie substancji testowej w hodowlach statycznych na okres wynoszący zwykle 72 godziny. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu trwania badania, skutki można ocenić na przestrzeni kilku pokoleń.

Odpowiedź układu polega na ograniczeniu wzrostu w szeregu kultur glonów (badanych jednostek) wystawionych na działanie różnych stężeń substancji testowej. Odpowiedź ocenia się w funkcji stężenia w stosunku do średniego wzrostu replikatu, kultur kontrolnych niepoddawanych ekspozycji. Dla pełnego wyrażenia odpowiedzi układu na toksyczne oddziaływanie (optymalnej czułości), kulturom umożliwia się nieograniczony wykładniczy wzrost w dostatecznych warunkach odżywczych i przy stałym świetle przez wystarczający czas, aby zmierzyć zmniejszenie właściwej szybkości wzrostu.

Wzrost i inhibicję wzrostu określa się ilościowo poprzez pomiary biomasy glonów w funkcji czasu. Biomasa glonów określa się jako ciężar masy suchej przypadający na objętość, np. mg glonów/litr roztworu testowego. Jednakże ciężar masy suchej jest trudny do zmierzenia i dlatego używa się parametrów zastępczych. Spośród tych surogatów najczęściej używa się liczby komórek. Do innych zastępczych parametrów należy objętość komórek, fluorescencja, gęstość optyczna itp. Należy znać współczynnik przeliczenia pomiędzy mierzonym parametrem zastępczym a biomasa.

Punktem końcowym badania jest inhibicja wzrostu wyrażona jako logarytmiczny przyrost biomasy (średnia właściwa szybkość wzrostu) w ciągu okresu ekspozycji. Ze średnich właściwych szybkości wzrostu zarejestrowanych w serii roztworów testowych wyznacza się stężenie powodujące inhibicję wzrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się jako $E_r C_x$ (np. $E_r C_{50}$).

Do celów stosowania tej metody w ramach unijnego prawodawstwa, z powodów opisanych w pkt 2.2 poniżej, obliczanie wyników powinno opierać się na średniej właściwej szybkości wzrostu. Dodatkową zmienną odpowiedzi użytą w niniejszej metodzie badawczej jest uzysk, który może być wymagany do spełnienia określonych wymogów regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on określony jako biomasa na końcu okresu ekspozycji minus biomasa na początku okresu ekspozycji. Z uzysku zarejestrowanego w serii roztworów testowych oblicza się stężenie powodujące inhibicję uzysku o określone x % (np. 50 %) i wyraża się jako $E_y C_x$ (np. $E_y C_{50}$).

Ponadto, można statystycznie wyznaczyć najmniejszy obserwowany poziom stężenia (LOEC) oraz nieobserwowany wpływ stężenia (NOEC).

1.5. INFORMACJE O SUBSTANCJI TESTOWEJ

Informacje o substancji testowej, które mogą być przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość, trwałość w warunkach badania, własności pochłaniania światła, pKa oraz wyniki badań przemiany, w tym podatności na rozkład biologiczny w wodzie.

Należy znać rozpuszczalność w wodzie, współczynnik podziału oktanol/woda (P_{ow}) oraz ciśnienie pary substancji testowej i powinna być dostępna potwierdzona metoda kwantyfikacji substancji w roztworach testowych z podaną wydajnością odzysku i granicą wykrywalności.

1.6. SUBSTANCJA ODNIESIENIA

Jako sposób sprawdzenia procedury badania, można zbadać substancję(-e) odniesienia, taką jak 3,5-dichlorofenol stosowany w międzynarodowej próbie pierścieniowej (4). Jako substancji odniesienia dla zielenic można również użyć dwuchromianu potasowego. Pożądane jest zbadanie substancji odniesienia co najmniej dwa razy w roku.

1.7. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne muszą być spełnione następujące kryteria wykonania:

- Biomasa w kulturach kontrolnych powinna wzrosnąć wykładniczo o czynnik wynoszący co najmniej 16 w ciągu 72-godzinne okresu badania. Odpowiada to właściwej szybkości wzrostu wynoszącej $0,92 \text{ dzień}^{-1}$. Dla najczęściej używanych gatunków, szybkość wzrostu jest zazwyczaj znacznie wyższa (zob. dodatek 1). Kryterium to może nie być spełnione, gdy użyty jest gatunek, który wzrasta wolniej niż wymienione w dodatku 1. W takim przypadku okres badania można przedłużyć, tak aby uzyskać co najmniej 16-krotny wzrost w kulturach kontrolnych, przy czym wzrost musi być wykładniczy w ciągu całego okresu badania. Okres badania można skrócić do co najmniej 48 godz., aby utrzymać nieograniczony wykładniczy wzrost w ciągu badania, o ile osiągnięta zostanie krotność wynosząca minimum 16.
- Średni współczynnik zmienności dla właściwych szybkości wzrostu według poszczególnych odcinków (dni 0–1, 1–2 i 2–3, dla 72-godzinnych badań) w kulturach kontrolnych (zob. sekcja 1.2 pod hasłem „współczynnik zmienności”) nie może przekraczać 35 %. Obliczanie właściwej szybkości wzrostu według poszczególnych odcinków podano w akapicie drugim sekcji 2.2.1. Kryterium to stosuje się do średniej wartości współczynników zmienności obliczonej dla replikatowych kultur kontrolnych.
- Współczynnik zmienności średnich właściwych szybkości wzrostu w ciągu całego okresu badania w replikacyjnych kulturach kontrolnych nie może przekroczyć 7 % w badaniach z udziałem *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Desmodesmus subspicatus*. Dla innych, rzadziej badanych gatunków, wartość ta nie powinna przekraczać 10 %.

1.8. OPIS METODY

1.8.1. Aparatura

Użyte do badania naczynia oraz inne urządzenia, które będą się stykać z roztworami testowymi, powinny być wykonane w całości ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Sprzęt należy gruntownie umyć w celu zapewnienia, że jakiegokolwiek zanieczyszczenia organiczne lub nieorganiczne nie będą zakłócać wzrostu glonów ani składu roztworów testowych.

Naczyniami używanymi do badania są zwykle kolby szklane o wymiarach pozwalających na uzyskanie dostatecznej objętości kultur do pomiarów podczas badania oraz należyte przenikanie masy CO_2 z atmosfery (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.9). Należy zwrócić uwagę, że objętość cieczy musi być wystarczająca dla oznaczeń analitycznych (zob. akapit piąty w sekcji 1.8.11).

Ponadto wymagane będą niektóre lub wszystkie spośród następujących urządzeń:

- Urządzenia do hodowli kultur: zalecana jest kabina lub komora, w której wybrana temperatura inkubacji może być utrzymywana w granicach $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Przyrządy do pomiaru światła: należy zwrócić uwagę, że na mierzoną wartość będzie mieć wpływ metoda pomiaru natężenia światła, w szczególności typ receptora (kolektora). Pomiaru należy wykonywać najlepiej przy użyciu receptora sferycznego (4π) (który reaguje na bezpośrednie i odbite światło ze wszystkich kątów powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) lub receptora 2π (który reaguje na światło ze wszystkich kątów powyżej płaszczyzny pomiaru).
- Aparatura do określania biomasy glonów. Liczbę komórek, która jest najczęściej stosowanym parametrem zastępczym dla biomasy glonów, można wyznaczyć za pomocą elektronicznego licznika cząstek, mikroskopu z komorą do liczenia oraz cytometru przepływowego. Inne surogaty biomasy można mierzyć przy pomocy cytometru, fluorymetru, spektrofotometru lub kolorymetru. Pomocny w obliczeniu jest współczynnik przeliczeniowy wiążący liczbę komórek z ciężarem masy suchej. Aby zapewnić użyteczne pomiary przy niskich stężeniach biomasy, gdy używa się spektrofotometru, może być niezbędne użycie kuwet o długości ścieżki światła co najmniej 4 cm.

1.8.2. **Badane organizmy**

Można użyć kilku gatunków nieprzylączonych mikroglonów i cyanobakterii. Wykazano, że gdy stosuje się procedurę badania określoną w niniejszej metodzie badawczej, to odpowiednie są szczepy wymienione w dodatku 1.

Jeżeli użyte są inne gatunki, to należy podać szczep i/lub pochodzenie. Należy potwierdzić, że można utrzymać wykładniczy wzrost wybranych do badania glonów w ciągu całego okresu badania w panujących warunkach.

1.8.3. **Pożywka wzrostowa**

Zaleca się dwie alternatywne pożywki wzrostowe, pożywkę OECD i pożywkę AAP. Składy tych pożywek przedstawiono w dodatku 2. Należy zwrócić uwagę, że wartość pH i zdolność buforująca (regulowanie wzrostu pH) tych dwu pożywek są różne. Dlatego wyniki badań mogą być różne, w zależności od użytej pożywki, zwłaszcza gdy badane są substancje jonizujące się.

Do niektórych celów, np. gdy bada się metale i czynniki chelatujące lub gdy wykonuje się badanie przy różnych wartościach pH, może być konieczna modyfikacja pożywki wzrostowej. Użycie zmodyfikowanej pożywki należy szczegółowo opisać i uzasadnić (3)(4).

1.8.4. **Stężenie początkowej biomasy**

Początkowa biomasa w badanych kulturach musi być taka sama i dostatecznie mała, aby umożliwić wykładniczy wzrost w ciągu całego okresu inkubacji bez ryzyka wyczerpania składnika pokarmowego. Początkowa biomasa nie może przekraczać 0,5 mg/l w przeliczeniu na masę suchą. Zalecane są następujące początkowe skupienia komórek:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	5×10^3 – 10^4	komórek/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	2 – 5×10^3	komórek/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	komórek/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	komórek/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	5×10^4 – 10^5	komórek/ml

1.8.5. **Stężenia substancji testowej**

Zakres stężenia, w którym mogą wystąpić wpływy, można wyznaczyć na podstawie wyników prób określania zakresu. Dla końcowego definitywnego badania należy wybrać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny o współczynniku nieprzekraczającym 3,2. Dla substancji wykazujących płaską krzywą odpowiedzi stężenia może być uzasadniony większy współczynnik. Szereg stężeń powinien najlepiej obejmować zakres powodujący inhibicję szybkości wzrostu glonów o 5–75 %.

1.8.6. **Replikaty i próby kontrolne**

Plan badania powinien obejmować trzy replikaty przy każdym stężeniu testowym. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, to plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę replikatów przypadających na stężenie. Liczba replikatów kontrolnych musi wynosić co najmniej trzy, a najlepiej powinna być dwukrotnie większa od liczby replikatów użytych dla każdego stężenia testowego.

Do analitycznych oznaczeń stężeń substancji testowej można sporządzić oddzielny zestaw roztworów testowych (zob. akapit czwarty i szósty w sekcji 1.8.11).

Gdy do rozpuszczenia substancji testowej użyty jest rozpuszczalnik, to w planie badania należy ująć dodatkowe próby kontrolne zawierające rozpuszczalnik o tym samym stężeniu, co w badanych kulturach.

1.8.7. **Przygotowanie kultury inokulum**

W celu przystosowania badanych glonów do warunków badania oraz zapewnienia, że znajdują się one w fazie wykładniczego wzrostu, gdy są użyte do inokulacji roztworów testowych, kulturę inokulum w pożywce próbnej przygotowuje się 2–4 dni przed rozpoczęciem badania. Biomasa glonów należy skorygować w celu umożliwienia, aby w kulturze inokulum panował wzrost wykładniczy do czasu rozpoczęcia badania. Kulturę inokulum inkubuje się w tym samym warunkach, co kultury próbne. Należy zmierzyć przyrost biomasy w kulturze inokulum, aby zapewnić, że wzrost zawiera się w normalnym zakresie dla badanego szczepu w warunkach hodowania kultury. Przykład procedury dotyczącej hodowania kultury glonów opisano w dodatku 3. Aby uniknąć synchronicznego podziału komórek podczas badania, może być wymagany drugi krok reprodukcji kultury inokulum.

1.8.8. Sporządzenie roztworów testowych

Wszystkie roztwory testowe muszą zawierać takie same stężenia pożywki wzrostowej i początkowej biomasy badanych glonów. Roztwory testowe o wybranych stężeniach zwykle sporządza się przez zmieszanie roztworu podstawowego substancji testowej z pożywką wzrostową i kulturą inokulacyjną. Roztwory podstawowe zwykle sporządza się rozpuszczając substancję testową w pożywce.

Jako nośników służących do dodania substancji o małej rozpuszczalności w wodzie do pożywki można użyć rozpuszczalników, np. acetonu, alkoholu t-butylowego i dwumetyloformamidu (2)(3). Stężenie rozpuszczalnika nie powinno przekraczać 100 µl/l i takie samo stężenie rozpuszczalnika należy dodać do wszystkich kultur (wraz z kontrolnymi) w badanej serii.

1.8.9. Inkubacja

Przykryć naczynia badawcze korkami przepuszczającymi powietrze. Naczynia wstrząsa się i umieszcza w aparacie do hodowli kultur. Podczas badania niezbędne jest utrzymanie glonów w zawieszynie i umożliwienie wnikania CO₂. W tym celu należy stosować ciągle wstrząsanie lub mieszanie. Kultury należy utrzymywać w przedziale temperatury 21–24 °C, regulowanej w granicach ± 2 °C. Dla gatunków innych niż wymienione w dodatku 1, np. gatunków tropikalnych, odpowiednie mogą być wyższe temperatury, pod warunkiem że spełnione będą kryteria ważności. Kolby zaleca się umieścić losowo i codziennie zmieniać ich położenie w inkubatorze.

pH pożywki kontrolnej nie powinno wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostek. W przypadku metali i związków, które częściowo jonizują się przy pH w pobliżu pH badania może być konieczne ograniczenie dryftu pH, aby otrzymać odtwarzalne oraz dobrze określone wyniki. Dryft < 0,5 jednostek pH jest technicznie możliwy i może być osiągnięty przez zapewnienie należytej szybkości wnikania masy CO₂ z otaczającego powietrza do roztworu testowego, np. przez zwiększanie szybkości wstrząsania. Inną możliwością jest zmniejszenie zapotrzebowania na CO₂ przez zmniejszenie początkowej biomasy lub skrócenie czasu trwania badania.

Powierzchnia, na której następuje inkubacja kultur, powinna otrzymywać ciągle, równomierne oświetlenie np. typu „chłodnego światła białego” lub „światła dziennego”. Szczepy glonów i cyjanobakterii różnią się pod względem swojego zapotrzebowania na światło. Natężenie światła należy dobrać w taki sposób, aby odpowiadało ono organizmowi wybranemu do badania. Dla zalecanych gatunków zielonych glonów natężenie światła na poziomie roztworów testowych wybiera się z zakresu 60–120 µE·m⁻²·s⁻¹, mierząc w skutecznym dla fotosyntezy przedziale długości fali 400–700 nm przy użyciu odpowiedniego receptora. Niektóre gatunki, w szczególności *Anabaena flos-aquae*, rosną dobrze przy mniejszych natężeniach światła, a przy wyższych mogą ulec uszkodzeniu. Dla takich gatunków należy wybrać średnie natężenie światła w zakresie 40–60 µE·m⁻²·s⁻¹. (Dla przyrządów do pomiaru światła wykalibrowanych w luksach, zalecanemu natężeniu światła 60–120 µE·m⁻²·s⁻¹ odpowiada w przybliżeniu równoważny zakres 4440–8880 luksów dla chłodnego światła białego). Natężenie światła nie powinno wahać się bardziej niż ± 15 % od średniego natężenia światła na powierzchni inkubacji.

1.8.10. Czas trwania badania

Badanie zwykle trwa 72 godzin. Jednakże, można zastosować krótsze lub dłuższe czasy trwania badania, pod warunkiem że mogą być spełnione kryteria ważności podane w sekcji 1.7.

1.8.11. Pomiary i oznaczenia analityczne

Biomasa glonów w każdej kolbie określa się co najmniej raz dziennie podczas okresu badania. Jeżeli pomiary dokonywane są na małych objętościach pobranych z roztworu testowego za pomocą pipety, to nie należy wprowadzać ich z powrotem do roztworu.

Pomiar biomasy wykonuje się poprzez ręczne zliczanie komórek przy pomocy mikroskopu lub elektronicznego licznika cząstek (określając liczbę komórek lub bioobjętość). Można zastosować alternatywne techniki, np. cytometrię przepływową, fluorescencję chlorofilu *in vitro* lub *in vivo* (6) (7) lub gęstość optyczną, pod warunkiem że można wykazać zadowalającą korelację z biomasą w całym zakresie biomasy występującym w badaniu.

pH roztworów mierzy się na początku i na końcu badania.

Jeśli dostępna jest procedura analityczna dla oznaczania badanej substancji w zastosowanym zakresie stężenia, roztwory testowe należy analizować celem sprawdzenia początkowych stężeń i utrzymania stężeń ekspozycji podczas badania.

W przypadku gdy jest prawdopodobne, że stężenie będą w trakcie badania odbiegać od nominalnych wartości o mniej niż 20 %, może być wystarczająca analiza stężenia substancji testowej na początku i końcu badania niskiego i wysokiego stężenia testowego oraz stężenia około spodziewanego EC_{50} . Gdy natomiast jest mało prawdopodobne, że stężenia pozostaną w granicach 80–120 % nominalnej wartości, to zaleca się analizę wszystkich stężeń testowych na początku i końcu badania. Dla substancji lotnych, nietrwałych lub silnie adsorbujących zaleca się dodatkowe pobieranie próbek do analizy w odstępach 24-godzinnych w ciągu okresu ekspozycji, aby lepiej określić stratę substancji testowej. Dla tych substancji potrzebne będą dodatkowe replikaty. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń substancji testowej musi być wykonywane tylko na jednym naczyniu z replikatem przy każdym stężeniu testowym (lub na zawartościach naczyń połączonych według replikatu).

Pożywkę testową sporządzoną specjalnie do analizy stężeń ekspozycji podczas badania należy potraktować identycznie, jak pożywki użyte do badania, tzn. należy je zaszczerpić glonami i inkubować w identycznych warunkach. Jeżeli wymagana jest analiza stężenia rozpuszczonej substancji testowej, to może być konieczne oddzielenie glonów od pożywki. Oddzielenia należy dokonać najlepiej przez odwirowanie przy małej sile grawitacji, wystarczającej do osadzenia się glonów.

Jeśli istnieją dowody, że stężenie substancji testowej zostało zadowalająco utrzymane w granicach ± 20 % nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych wartościach początkowych. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia jest większe niż ± 20 %, to analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu w ciągu ekspozycji lub na modelach opisujących spadek stężenia substancji testowej (3)(8).

Badanie inhibicji wzrostu glonów odbywa się w bardziej dynamicznym układzie próbnym niż większość innych krótkookresowych badań toksyczności wodnej. W rezultacie rzeczywiste stężenia ekspozycji mogą być trudne do określenia, zwłaszcza dla substancji adsorbujących badanych w niskich stężeniach. W takich przypadkach zniknięcie substancji z roztworu przez adsorpcję do rosnącej masy glonów nie oznacza, że jest ona utracona z badanego układu. Podczas analizowania wyniku badania należy sprawdzić, czy zmniejszeniu stężenia substancji testowej w trakcie badania towarzyszy zmniejszenie inhibicji wzrostu. Jeżeli tak się dzieje, to można rozważyć zastosowanie odpowiedniego modelu opisującego spadek stężenia substancji testowej (8). Jeżeli nie, to odpowiednim może być oparcie analizy wyników na początkowych (nominalnych lub zmierzonych) stężeniach.

1.8.12. **Inne obserwacje**

Należy przeprowadzić obserwacje mikroskopowe w celu sprawdzenia, czy wygląd kultury inokulacyjnej jest normalny i zdrowy oraz zaobserwowania ewentualnego anormalnego wyglądu glonów (który może być spowodowany ekspozycją na substancję testową) na końcu badania.

1.8.13. **Badanie graniczne**

W pewnych okolicznościach, np. gdy wstępne badanie wskazuje, że substancja testowa nie ma toksycznych skutków w stężeniach do $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lub do jej granicznej rozpuszczalności w pożywce testowej (zależnie od tego, co jest niższe), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu odpowiedzi grupy kontrolnej i jednej grupy poddawanej zabiegowi (o stężeniu $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lub równym granicznej rozpuszczalności). Bardzo zalecane jest, aby było to poparte analizą stężenia ekspozycji. Do badania granicznego stosują się wszystkie poprzednio opisane warunki badania i kryteria ważności, poza tym że liczba replikatów poddawanych zabiegowi powinna wynosić co najmniej sześć. Zmienne odpowiedzi w grupie poddawanemu zabiegowi i w grupie kontrolnej można analizować przy użyciu testu statystycznego do porównania średnich, np. testu t Studenta. Jeżeli wariancje obydwu grup są nierówne, to należy wykonać test t skorygowany dla nierównych wariancji.

1.8.14. **Modyfikacja w odniesieniu do mocno zabarwionych substancji**

Napromienienie (intensywność światła) powinno być bliskie najwyższych wartości zakresu przewidzianego w tej metodzie badania: $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lub wyższe.

Drogę strumienia światła należy skrócić poprzez ograniczenie objętości roztworów testowych (zakres od 5 do 25 ml).

Należy zapewnić częste poruszanie (np. poprzez umiarkowane potrząsanie), tak by glony były często wystawione na intensywne napromienienie na powierzchni kultury.

2. DANE

2.1. WYKREŚLENIE KRZYWYCH WZROSTU

Biomasa w naczyniach badawczych może być wyrażona w jednostkach surogatowego parametru użytego do pomiaru (np. liczby komórek, fluorescencji).

Należy zestawić w postaci tabelarycznej oszacowane stężenie biomasy w kulturach testowych i w kulturach kontrolnych wraz ze stężeniami badanego materiału i czasami pomiaru zarejestrowanymi z dokładnością co najmniej do pełnych godzin, aby sporządzić wykresy krzywych wzrostu. Na tym pierwszym etapie mogą być przydatne skale zarówno logarytmiczne, jak liniowe, lecz skale logarytmiczne są obowiązkowe i na ogół dają lepszą reprezentację zmienności przebiegu wzrostu podczas okresu badania. Należy zwrócić uwagę, że nachylenie linii (tangens kąta nachylenia) oznacza właściwą szybkość wzrostu.

Przy pomocy wykresów należy zbadać, czy kultury kontrolne wznoszą wykładniczo ze spodziewaną szybkością w ciągu całego badania. Należy krytycznie zbadać wszystkie punkty danych oraz wygląd wykresów i sprawdzić dane pierwotne i procedury pod kątem możliwych błędów. Sprawdzić w szczególności wszelkie punkty danych, które wydają się odchyłać o błąd systematyczny. Jeżeli jest oczywiste, że można stwierdzić i/lub uznać za wysoce prawdopodobne błędy proceduralne, to określony punkt danych oznacza się jako wartość oddaloną i nie ujmuje się w późniejszej analizie statystycznej. (Zerowe stężenie glonów w jednym z dwóch lub trzech naczyniach replikatów może oznaczać, że naczynie to nie zostało poprawnie zaszczepione lub zostało niewłaściwie wyczyszczone). Powody odrzucenia punktu danych jako wartości oddalonej należy wyraźnie podać w sprawozdaniu z badania. Akceptowanymi powodami są jedynie (rzadkie) błędy proceduralne, a nie tylko niedostateczna dokładność. Procedury statystyczne dotyczące identyfikacji wartości oddalonych mają ograniczone zastosowanie do zagadnienia tego typu i nie mogą zastąpić specjalistycznej opinii. Wartości oddalone (zaznaczone jako takie) należy najlepiej zachować wśród punktów danych przedstawionych w późniejszej graficznej lub tabelarycznej prezentacji danych.

2.2. ZMIENNE ODPOWIEDZI

Celem badania jest określenie wpływów substancji testowej na wzrost glonów. Niniejsza metoda badawcza opisuje dwie zmienne odpowiedzi, gdyż państwa członkowskie mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były możliwe do przyjęcia we wszystkich państwach członkowskich, skutki należy oceniać używając obydwu opisanych poniżej zmiennych odpowiedzi a) i b).

- a) Średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną odpowiedzi oblicza się na podstawie logarytmicznego przyrostu biomasy w ciągu okresu badania, wyrażonego na dzień.
- b) Uzysk: tą zmienną odpowiedzi jest biomasa na końcu badania minus początkowa biomasa.

Do celów stosowania tej metody w ramach unijnego prawodawstwa, z powodów opisanych poniżej, obliczanie wyników powinno opierać się na średniej właściwej szybkości wzrostu. Należy zwrócić uwagę, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwu zmiennych odpowiedzi nie są porównywalne i różnica musi być rozpoznana, gdy używa się wyników badania. Jeżeli zachowane są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, to wartości EC_x oparte o średnią właściwą szybkość wzrostu ($E_r C_x$) zwykle bywają wyższe od wartości opartych o uzysk ($E_v C_x$), ze względu na podstawę matematyczną odnośnych podejść. Nie należy tego interpretować jako różnicę czułości pomiędzy dwiema zmiennymi odpowiedzi, lecz jedynie że wartości te są matematycznie różne. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu oparte jest o ogólny wykładniczy przebieg wzrostu glonów w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność jest szacowana na podstawie wpływów na szybkość wzrostu, nie będąc zależną od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu kultury kontrolnej, nachylenia krzywej stężenie-odpowiedź lub czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte o zmienną odpowiedzi w postaci uzysku są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. $E_v C_x$ jest zależne od właściwej szybkości wzrostu gatunków glonów użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych szczepów glonów. Tej zmiennej odpowiedzi nie powinno się używać do porównywania czułości na czynniki toksyczne pomiędzy gatunkami glonów lub nawet różnymi ich szczepami. Choć do szacowania toksyczności naukowo preferowane jest posługiwanie się średnią właściwą szybkością wzrostu, to oszacowania toksyczności na podstawie uzysku są również ujęte w niniejszej metodzie badawczej, aby uczynić zadość obecnym wymaganiom regulacyjnym istniejącym w niektórych krajach.

2.2.1. Średnia szybkość wzrostu

Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost biomasy z równania dla każdego pojedynczego naczynia kultur kontrolnych i poddawanych zabiegowi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (dzień}^{-1}\text{)}$$

gdzie:

μ_{i-j} : jest średnią właściwą szybkością wzrostu od czasu i do j ,

X_i : jest biomasą o czasie i ,

X_j : jest biomasą o czasie j .

Dla każdej grupy poddawanej zabiegowi i grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

Obliczyć średnią właściwą szybkość wzrostu w ciągu całego czasu trwania badania (zwykle dni 0–3), jako początkową wartość używając nominalnie zaszczeploną biomasę, zamiast zmierzonej początkowej wartości, ponieważ w ten sposób zwykle uzyskuje się większą dokładność. Jeżeli urządzenie używane do pomiaru biomasy pozwala na dostatecznie dokładne określenie małej biomasy inokulum (np. cytometr przepływowy), to można użyć zmierzonego początkowego stężenia biomasy. Ocenic również szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, obliczoną jako właściwe szybkości wzrostu dla każdego dnia w trakcie badania (dni 0–1, 1–2 i 2–3) oraz zbadać, czy szybkość wzrostu w kulturze kontrolnej pozostaje stała (zob. kryteria walidacji, sekcja 1.7). Znacząco niższa właściwa szybkość wzrostu w pierwszym dniu od ogólnej średniej właściwej szybkości wzrostu może oznaczać fazę zwłoki. Podczas gdy fazę zwłoki można zminimalizować i praktycznie wyeliminować w kulturach kontrolnych przez odpowiednie rozmnożenie kultury pierwotnej, to faza zwłoki w kulturach poddanych ekspozycji może oznaczać regenerację po początkowym stresie toksycznym lub zmniejszoną ekspozycję wskutek straty substancji testowej (w tym jej sorpcji na biomacie glonów) po początkowej ekspozycji. Stąd, można określić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby ocenić skutki substancji testowej występujące w ciągu okresu ekspozycji. Istotne różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnią szybkością wzrostu oznaczają odchylenie od stałego wykładniczego wzrostu i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu.

Należy obliczyć procentową inhibicję szybkości wzrostu dla każdego replikatu poddawane go zabiegowi, według następującego równania:

$$\%I_T = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

gdzie:

$\%I_T$: procentowa inhibicja średniej właściwej szybkości wzrostu,

μ_C : wartość średnia średniej właściwej szybkości wzrostu (μ) w grupie kontrolnej,

μ_T : średnia właściwa szybkość wzrostu dla replikatu poddawane go zabiegowi.

Gdy do sporządzenia roztworów testowych użyte są rozpuszczalniki, w obliczeniu procentowej inhibicji należy użyć grup kontrolnych z rozpuszczalnikiem zamiast grup kontrolnych bez rozpuszczalnika.

2.2.2. Uzysk

Uzysk oblicza się jako biomasę na końcu badania minus biomasę na początku badania dla każdego pojedynczego naczynia z replikatami kontrolnymi i replikatami poddawane go zabiegowi. Dla każdego stężenia testowego i grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość uzysku wraz z oszacowaniami wariancji. Dla każdego replikatu poddawane go zabiegowi można obliczyć procentową inhibicję uzysku ($\%I_y$) w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100$$

gdzie:

$\%I_y$: procentowa inhibicja uzysku,

Y_C : średnia wartość uzysku w grupie kontrolnej,

Y_T : wartość uzysku dla replikatu poddawane go zabiegowi.

2.3. WYKREŚLENIE KRZYWEJ ODPOWIEDZI STĘŻENIOWEJ

Należy wykreślić procent inhibicji w zależności od logarytmu stężenia substancji testowej i dokładnie zbadać wykres, pomijając każdy punkt danych, który został potraktowany jako wartość oddalona w pierwszej fazie. Należy dopasować linię gładką pomiędzy punktami danych na oko lub za pomocą komputerowej interpolacji, aby uzyskać pierwsze wrażenie zależności odpowiedzi stężeniowej, a następnie kontynuować z zastosowaniem bardziej szczegółowej metody, najlepiej komputerowej metody statystycznej. W zależności od zamierzonego wykorzystania danych, jakości (dokładności) i ilości danych, jak również dostępności narzędzi do analizy danych, można postanowić (co niekiedy jest należyście uzasadnione), aby przerwać analizę danych na tym etapie i po prostu odczytać główne wielkości EC_{50} i EC_{10} (oraz/lub EC_{20}) z dopasowanej na oko krzywej (zob. również poniżej — sekcja dotycząca skutków stymulacyjnych). Do ważnych powodów niezastosowania metody statystycznej mogą należeć następujące:

- Dane nie są odpowiednie do tego, aby metody komputerowe przyniosły wyniki bardziej wiarygodne od uzyskanych na podstawie specjalistycznej oceny — w takich sytuacjach, niektóre programy komputerowe mogą nawet nie dostarczyć wiarygodnego rozwiązania (iteracje mogą nie osiągnąć zbieżności, itp.).
- Odpowiedzi stymulacyjnego wzrostu nie mogą być w zadowalający sposób poddane obróbce przy użyciu dostępnych programów komputerowych (zob. poniżej).

2.4. PROCEDURY STATYSTYCZNE

Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie–odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu linearyzującej transformacji danych odpowiedzi — na przykład do jednostek probit lub logit albo Weibulla (9), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej znoszą nieuniknione nieregularności danych i odchylenia od gładkich rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowej lub do całkowitej inhibicji, nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (9). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit lub Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych kwantalowych (np. śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane z dostosowaniem do danych szybkości wzrostu lub biomasy. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (10), (11) i (12). Zastosowanie analizy regresji nieliniowej jest dalej opisane szczegółowo w dodatku 4.

Dla każdej zmiennej odpowiedzi, która ma być analizowana należy użyć zależności stężenie–odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . Gdy to możliwe, dla każdego oszacowania należy określić granice ufności 95 %. Dokładność dopasowania danych odpowiedzi do modelu regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić używając odpowiedzi indywidualnych replikatów, a nie średnich z grup poddawanych zabiegowi. Jeśli jednak dopasowanie krzywej nieliniowej jest trudne lub nie udaje się z powodu zbyt dużego rozrzutu danych, to problem można ominąć wykonując regresję na średnich z grup, jako praktyczny sposób ograniczenia wpływu podejrzewanych wartości oddalonych. Wybranie tej opcji należy zaznaczyć w sprawozdaniu z badania jako odstępstwo od normalnej procedury wynikłe stąd, że dopasowania krzywej przy pomocy indywidualnych replikatów nie dały dobrego rezultatu.

Oszacowania EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z ładowaniem początkowym (13), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.

W celu oszacowania LOEC, a stąd NOEC, oraz wpływów substancji testowej na szybkość wzrostu, konieczne jest porównanie średnich z grup poddawanych zabiegowi przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williamsa (14)(15)(16)(17)(18). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie homogeniczności wariancji pozostaje w mocy. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie lub za pomocą formalnego testu (18). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o homogeniczności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą logarytmicznego przekształcenia danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji jest skrajnie duża i nie może być skorygowana przez transformację, to należy rozważyć analizę za pomocą metod takich, jak testy trendu stopniowego obniżania Jonkheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (12).

Rozwój naukowy, jaki ostatnio nastąpił, doprowadził do zalecenia zarzucenia pojęcia NOEC i zastąpienia go regresją opartą o oszacowania punktowe EC_x . Dla niniejszego badania glonów nie ustalono odpowiedniej wartości x . Odpowiednim wydaje się przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej odpowiedzi), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10} , jak i EC_{20} .

2.5. STYMULACJA WZROSTU

Niekiedy obserwuje się stymulację wzrostu (ujemna inhibicja) przy niskich stężeniach. Może to wynikać z hormezy („toksycznej stymulacji”) lub z dodania stymulujących czynników wzrostu z badanym materiałem do użytej minimalnej pożywki. Należy zwrócić uwagę, że dodanie nieorganicznych składników odżywczych nie powinno mieć żadnego bezpośredniego wpływu, ponieważ badana pożywka powinna zachować nadmiar składników odżywczych w ciągu całego badania. Stymulację niskodawkową można zwykle pominąć w obliczeniach EC_{50} , chyba że jest skrajna. Jednakże, jeśli jest ona skrajna lub ma być obliczona wartość EC_x dla małego x , to mogą być wymagane specjalne procedury. Należy unikać usuwania odpowiedzi stymulacyjnych z analizy danych, jeśli to możliwe i jeżeli dostępne oprogramowania do dopasowywania krzywych nie może przyjąć drobnej stymulacji, to można posłużyć się interpolacją liniową z ładowaniem początkowym (19).

2.6. NIETOKSYCZNE HAMOWANIE WZROSTU

Materiały badane pochłaniające światło mogą przyczyniać się do redukcji szybkości wzrostu, ponieważ zacienienie zmniejsza ilość dostępnego światła. Takie fizyczne typy oddziaływań należy oddzielić od oddziaływań toksycznych przez zmodyfikowanie warunków badania i podać je odrębnie w sprawozdaniu. Wskazówki można znaleźć w (2) i (3).

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Substancja testowa:

- fizyczny charakter i stosowne własności fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, w tym czystość.

Badane gatunki:

- szczep, dostawca lub źródło oraz zastosowane warunki kultury.

Warunki badania:

- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania,
- opis planu badania: naczynia badawcze, objętości kultur, gęstość biomasy na początku badania,
- skład pożywki,
- stężenia testowe i replikaty (np. liczba replikatów, liczba stężeń testowych oraz zastosowany postęp geometryczny),
- opis sporządzania roztworów testowych, w tym użycia rozpuszczalników, itp.,
- aparatura do hodowli kultur,
- natężenie i jakość światła (źródło, jednorodność),
- temperatura,
- stężenia testowe: nominalne stężenia testowe oraz wszelkie wyniki analiz określania stężenia substancji testowej w naczyniach badawczych. Należy podać sprawność odzyskową metody oraz granicę kwantyfikacji w zestawie badawczym,
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej,

- metoda określania biomasy oraz dowody korelacji pomiędzy mierzonym parametrem a ciężarem masy suchej.

Wyniki:

- wartości pH na początku i na końcu badania przy wszystkich zabiegach,
- biomasa dla każdej kolby w każdym punkcie pomiarowym oraz metoda pomiaru biomasy,
- krzywe wzrostu (wykres zależności biomasy od czasu),
- obliczone zmienne odpowiedzi dla każdego replikatu poddawanemu zabiegowi, wraz z wartościami średnimi i współczynnikami zmienności dla replikatów,
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek,
- oszacowania toksyczności dla zmiennych odpowiedzi, np. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} oraz związane z nimi przedziały ufności. W przypadku obliczenia — LOEC i NOEC oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia,
- jeżeli zastosowana została ANOVA — wielkość skutku, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica),
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie,
- wszelkie zaobserwowane skutki, np. morfologiczne zmiany glonów,
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania wynikający z odstępstw od niniejszej metody badawczej.

4. LITERATURA

- (1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- (2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.
- (3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.
- (4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.
- (5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692.
- (6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.
- (7) Slovencey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), pp. 919–925.
- (8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 2073–2079.
- (9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713–718.
- (10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157–167.
- (11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11: 1485–1494.
- (12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
 - (14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121.
 - (15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
 - (16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
 - (17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
 - (18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
 - (19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Dodatek 1

Szczepy wykazane jako odpowiednie do badania

Zielenice

- *Pseudokirchneriella subcapitata*, (poprzednio znana pod nazwą *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG
- *Desmodesmus subspicatus* (poprzednio znana pod nazwą *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Okrzemki

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyjanobakterie

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Źródła szczepów

Zalecane szczepy są dostępne w postaci kultur jednoalgowych z następujących kolekcji (w kolejności alfabetycznej):

ATCC: American Type Culture Collection (Amerykańska kolekcja typokulturowa)
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110–2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa (Kolekcja kulturowa glonów i pierwotniaków)
Institute of Freshwater Ecology (Instytut Wód Słodkich),
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria
LA22 0LP
ZJEDNOCZONE KRÓLESTWO

SAG: Collection of Algal Cultures (Kolekcja kultur glonów)
Inst. Plant Physiology (Instytut Fizjologii Roślin)
University of Göttingen (Uniwersytet w Getyndze)
Nicholausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
NIEMCY

UTEX Culture Collection of Algae (Kulturowa kolekcja glonów)
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology (Sekcja Biologii Molekularnej, Komórkowej i Rozwojowej)
School of Biological Sciences (Wydział Nauk Biologicznych)
the University of Texas at Austin (Uniwersytet Tekszański w Austin)
Austin, Texas 78712
USA

Wygląd i charakterystyka zalecanych gatunków

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Wygląd	Zakrzywione, skręcone pojedyncze komórki	Owalne, przeważnie pojedyncze komórki	Pałeczki	Łańcuchy owalnych komórek	Pałeczki
Rozmiar (L × W) μm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objętość komórki (μm ³ /komórkę)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Ciężar masy suchej (mg/komórkę)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Szybkość wzrostu ⁽³⁾ (dzień ⁻¹)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Zmierzono za pomocą elektronicznego licznika cząstek.

⁽²⁾ Obliczono na podstawie rozmiaru.

⁽³⁾ Najczęściej obserwowana szybkość wzrostu w pożywce OECD przy natężeniu światła ok. 70 μE·m⁻²·s⁻¹ i w temp. 21 °C.

Szczegółne zalecenia dotyczące hodowli kultur i postępowania z zalecanymi gatunkami próbnymi

Pseudokirchneriella subcapitata i *Desmodesmus subspicatus*

Te zieleńce są na ogół łatwe do utrzymania w różnych pożywkach do hodowli kultur. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek dostępne są od kolekcji kultur. Komórki są zazwyczaj odosobnione i pomiary gęstości komórek można łatwo wykonać przy użyciu elektronicznego licznika cząstek lub mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Do hodowania kultury podstawowej można używać różnych pożywek. Szczególnie ważne jest niedopuszczenie, aby podczas odnawiania kultura seryjna nie przekroczyła logarytmicznej fazy wzrostu, gdyż powrót do normy w tym momencie jest trudny.

Anabaena flos-aquae tworzy skupiska wchodzących w siebie nawzajem łańcuchów komórek. Rozmiar tych skupisk może zmieniać się w zależności od warunków hodowania kultury. Może być konieczne rozbicie tych skupisk, gdy do określania biomasy stosuje się liczenie mikroskopowe lub elektroniczny licznik cząstek.

Do rozbicia łańcuchów w celu zmniejszenia zmienności zliczania można zastosować nadźwiękawianie. Nadźwiękawianie dłuższe niż wymagane do rozbicia łańcuchów na krótsze odcinki może zniszczyć komórki. Natężenie i czas trwania nadźwiękawiania muszą być identyczne dla każdego zabiegu.

Aby pozwolić skompensować zmienność, należy zliczyć na hemocytometrze dostateczną ilość pól (co najmniej 400 komórek). Poprawi to rzetelność mikroskopowych oznaczeń gęstości.

Do wyznaczenia całkowitej objętości komórek *Anabaena* można użyć elektronicznego licznika cząstek, po uprzednim rozbiciu łańcuchów komórek za pomocą ostrożnego nadźwiękawiania. Należy wyregulować energię nadźwiękawiania, aby uniknąć rozerwania komórek.

Należy użyć mieszadła wirowego lub podobnej odpowiedniej metody dla zapewnienia, że zawiesina glonów użyta do zaszczerpienia naczyń badawczych jest dobrze wymieszana i jednorodna.

Naczynia badawcze należy ustawić na orbitalnym lub posuwno-zwrotnym stole wibracyjnym przy około 150 obrotach na minutę. Alternatywnie, aby zmniejszyć tendencję *Anabaena* do tworzenia skupisk, można stosować przerywane mieszanie. Jeżeli występuje tworzenie się skupisk, należy dołożyć starań, aby uzyskać reprezentatywne próbki do pomiarów biomasy. Aby rozbić skupiska glonów, przed pobraniem próbek może być konieczne energiczne mieszanie.

Synechococcus leopoliensis

Do hodowania kultury podstawowej można używać różnorodnych pożywek wzrostowych. Informacje o odpowiednich pożywkach są dostępne od kolekcji kultur.

Synechococcus leopoliensis rośnie w postaci odosobnionych komórek w kształcie pałeczek. Komórki są bardzo małe, co komplikuje stosowanie zliczania mikroskopowego do pomiarów biomasy. Przydatne są tu elektroniczne liczniki cząstek z wyposażeniem do liczenia cząstek o rozmiarach do około 1 µm. Można również stosować pomiary fluorometryczne *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Do hodowania kultury podstawowej można używać różnorodnych pożywek wzrostowych. Informacje o odpowiednich pożywkach są dostępne od kolekcji kultur. Należy zwrócić uwagę, że w pożywce wymagany jest krzemian.

Navicula pelliculosa w pewnych warunkach wzrostu może tworzyć skupiska. Z uwagi na wytwarzanie lipidów komórki glonów wykazują niekiedy tendencję do zbierania się w warstewce powierzchniowej. W takich warunkach, podczas pobierania próbek do oznaczania biomasy należy podjąć szczególne środki, aby uzyskać reprezentatywne próbki. Może być potrzebne energiczne mieszanie, np. przy użyciu mieszadła wirowego.

Dodatek 2

Pożywki wzrostowe

Można używać jednej z następujących dwu pożywek wzrostowych:

Pożywka OECD: Oryginalna pożywka OECD TG 201, również zgodna z ISO 8692

Pożywka AAP (EPA USA), również zgodna z ASTM.

Sporządzając te pożywki, należy użyć substancji chemicznych o czystości do analizy oraz wody dejonizowanej.

Skład pożywki AAP (EPA USA) oraz pożywki OECD TG 201

Składnik	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Stosunek molowy EDTA do żelaza przekracza nieco jeden. Zapobiega to wytrąceniu się żelaza, a jednocześnie zminimalizowana jest chelatacja jonów metali ciężkich.

W badaniu z użyciem okrzemka *Navicula pelliculosa*, obydwie pożywki należy uzupełnić Na₂SiO₃·9H₂O, aby uzyskać stężenie 1,4 mg Si/l.

pH pożywki uzyskuje się przy równowadze pomiędzy układem węglanowym pożywki a ciśnieniem cząstkowym CO₂ w powietrzu atmosferycznym. Przybliżona zależność pomiędzy pH w temp. 25 °C a stężeniem molowym wodorowęglanu jest następująca:

$$pH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3^-]$$

Przy 15 mg NaHCO₃, pH_{eq} = 7,5 (amerykańska pożywka EPA), a przy 50 mg NaHCO₃/l, pH_{eq} = 8,1 (pożywka OECD).

Skład pierwiastkowy pożywek

Pierwiastek	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Sporządzenie pożywki OECD

Składnik odżywczy	Stężenie w roztworze podstawowym
Roztwór podstawowy 1: makroskładniki odżywcze	
NH ₄ Cl	1,5 g·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g·l ⁻¹
Roztwór podstawowy 2: żelazo	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg·l ⁻¹
Roztwór podstawowy 3: pierwiastki śladowe	
H ₃ BO ₃	185 mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg·l ⁻¹
Roztwór podstawowy 4: wodorowęglan	
NaHCO ₃	50 g·l ⁻¹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Roztwory podstawowe należy wysterylizować przez filtrację przeponową (średnia średnica poru 0,2 µm) lub przez obróbkę w autoklawie (120 °C, 15 min). Roztwory należy przechowywać w ciemności w temperaturze 4 °C.

Roztworów 2 i 4 nie poddawać obróbce w autoklawie, lecz wysterylizować je przez filtrację przeponową.

Sporządzić pożywkę wzrostową dodając odpowiednią objętość roztworów podstawowych 1–4 do wody:

Dodać do 500 ml sterylizowanej wody:

- 10 ml roztworu podstawowego 1,
- 1 ml roztworu podstawowego 2,
- 1 ml roztworu podstawowego 3,
- 1 ml roztworu podstawowego 4.

Uzupełnić wodą sterylizowaną do 1 000 ml.

Odczekać należyty czas na utworzenie się równowagi pomiędzy pożywką a CO₂, jeśli potrzeba, stosując barbotaż sterylnym filtrowanym powietrzem przez kilka godzin.

Sporządzenie pożywki AAP

A1.1. Dodać 1 ml każdego roztworu podstawowego wymienionego w A1.2.1–A1.2.7 do około 900 ml wody dejonizowanej lub destylowanej, a następnie rozcieńczyć do 1 l.

A1.2. Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe składniki w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Reagenty A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 oraz A1.2.4 można połączyć w jeden roztwór podstawowy.

A1.2.1. NaNO₃—12,750 g.

A1.2.2. MgCl₂·6H₂O—6,082 g.

A1.2.3. CaCl₂·2H₂O—2,205 g.

A1.2.4. Roztwór podstawowy mikroskładników odżywczych—(zob. A1.3).

A1.2.5. MgSO₄·7H₂O—7,350 g.

A1.2.6. K₂HPO₄—0,522 g.

A1.2.7. NaHCO₃—7,500 g.

A1.2.8. Na₂SiO₃·9H₂O—Zob. uwaga A1.1.

UWAGA A1.1 — Użyć tylko do badanych gatunków okrzemków. Można dodać bezpośrednio (202,4 mg) lub za pomocą roztworu podstawowego, aby otrzymać końcowe stężenie w pożywce wynoszące 20 mg/l Si.

A1.3. Roztwór podstawowy mikroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe składniki w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej:

A1.3.1. H₃BO₃—92,760 mg.

A1.3.2. MnCl₂·4H₂O—207,690 mg.

A1.3.3. ZnCl₂—1,635 mg.

A1.3.4. FeCl₃·6H₂O—79,880 mg.

A1.3.5. CoCl₂·6H₂O—0,714 mg.

A1.3.6. Na₂MoO₄·2H₂O—3,630 mg.

A1.3.7. CuCl₂·2H₂O—0,006 mg.

A1.3.8. Na₂EDTA·2H₂O—150,000 mg.

[(Etylenodwunitrylo)czterooctan dwusodowy].

A1.3.9. Na₂SeO₄·5H₂O—0,005 mg. Zob. uwaga A1.2.

UWAGA A1.2 — Użyć tylko w pożywce dla kultur podstawowych gatunków okrzemków.

A1.4. Wyregulować pH do 7,5 ± 0,1 za pomocą 0,1 N lub 1,0 N NaOH lub HCl.

A1.5. Przefiltrować pożywkę do sterylnego pojemnika przez filtr przeponowy 0,22 μm, jeżeli ma być użyty licznik cząstek, lub filtr 0,45 μm, jeśli nie ma być użyty licznik cząstek.

A1.6. Pożywkę należy przechowywać w ciemności w temperaturze około 4 °C do czasu użycia.

Dodatek 3

Przykład procedury hodowania kultur glonów**Ogólne spostrzeżenia**

Celem hodowania kultur w oparciu o poniższą procedurę jest otrzymanie kultur glonów do badań toksyczności.

Należy użyć odpowiednich metod dla zapewnienia, że kultury glonów nie będą zakażone bakteriami. Pożądane mogą być kultury akseniczne, lecz muszą zostać utworzone i użyte kultury jednoalgowe.

Wszystkie operacje należy przeprowadzać w warunkach sterylnych, aby uniknąć zanieczyszczenia bakteriami i innymi glonami.

Sprzęt i materiały

Zob. w podsekcji „Aparatura” sekcji „Metoda badawcza”.

Procedury otrzymywania kultur glonów*Sporządzenie roztworów składników odżywczych (pożywek):*

Wszystkie odżywcze sole pożywki przygotowuje się w postaci stężonych roztworów podstawowych i przechowuje się w ciemnym i zimnym miejscu. Roztwory te sterylizuje się poprzez filtrację lub obróbkę w autoklawie.

Pożywkę sporządza się, dodając odpowiednią ilość roztworu podstawowego do sterylizowanej wody destylowanej, uważając, aby nie nastąpiło zakażenie. Do odżywki w postaci stałej dodaje się 0,8 procentu agaru.

Kultura podstawowa:

Kultury podstawowe są to nieduże kultury glonów, które przenosi się regularnie do świeżej pożywki, tak aby pełniła ona rolę początkowego materiału próbnego. Jeżeli kultury nie są regularnie używane, to tworzą smużki na nachylonych rurkach agaru. Należy przenieść je do świeżej pożywki co najmniej raz na dwa miesiące.

Kultury podstawowe hoduje się w kolbach stożkowych zawierających odpowiednią pożywkę (o objętości około 100 ml). Gdy glony są inkubowane w temperaturze 20 °C przy ciągłym oświetleniu, to wymagane jest cotygodniowe przenoszenie.

Podczas przenoszenia, pewną ilość „starej” kultury przenosi się przy pomocy sterylnych pipet do kolby ze świeżą pożywką, tak aby w przypadku gatunków szybko rosnących początkowe stężenie było około 100 razy mniejsze niż w starej kulturze.

Szybkość wzrostu gatunków można wyznaczyć z krzywej wzrostu. Jeśli jest ona znana, to możliwe jest oszacowanie gęstości, przy której kulturę należy przenieść do nowego medium. Musi to zostać wykonane, zanim kultura osiągnie fazę śmierci.

Kultura pierwotna:

Kultura pierwotna służy do dostarczenia pewnej ilości glonów, odpowiedniej do zaszczepienia kultur przeznaczonych do badania. Kultura pierwotna jest inkubowana w warunkach badania i zostaje użyta w chwili, gdy nadal wykładniczo wzrasta, zwykle po okresie inkubacji wynoszącym 2 do 4 dni. Gdy kultury algowe zawierają zdeformowane lub anormalne komórki, to należy je odrzucić.

Dodatek 4

Analiza danych za pomocą regresji nieliniowej**Zasady ogólne**

Odpowiedź w badaniach glonów i badaniach wzrostu innych mikroorganizmów — wzrost biomasy jest z natury zmienną ciągłą lub metryczną — szybkością procesu, jeśli użyta jest szybkość wzrostu oraz jej całką po czasie, jeśli wybrana jest biomasa. Obydwie zmienne odniesione są do odpowiedniej średniej odpowiedzi replikatowych nieeksponowanych grup kontrolnych wykazujących maksymalną odpowiedź dla narzuconych warunków — ze światłem i temperaturą jako głównymi decydującymi czynnikami w badaniu glonów. Układ jest rozłożony lub jednorodny i biomasa można rozpatrywać jako kontinuum, nie biorąc pod uwagę indywidualnych komórek. Rozkład wariancji typu odpowiedzi dla takiego układu wiąże się wyłącznie z czynnikami doświadczalnymi (zwykle opisywanymi przez logarytmiczno-normalne lub normalne rozkłady błędów). Stanowi to przeciwieństwo dla typowych odpowiedzi biooznaczenia z danymi kwintalowymi, dla których często przyjmuje się, że dominującą składową wariancji jest tolerancja indywidualnych organizmów (zazwyczaj o rozkładzie dwumianowym). Odpowiedziami kontrolnymi jest tu poziom zerowy lub tła.

W nieskomplikowanej sytuacji, znormalizowana lub względna odpowiedź, r , maleje monotonicznie od 1 (zerowe hamowanie) do 0 (100-procentowe hamowanie). Należy zwrócić uwagę, że wszystkie odpowiedzi mają związany z sobą błąd i że pozorne ujemne inhibicje można obliczyć jedynie jako wynik błędu przypadkowego.

Analiza regresji*Modele*

Celem analizy regresji jest ilościowe opisanie krzywej stężenie-odpowieź w postaci matematycznej funkcji regresji $Y = f(C)$ lub części $F(Z)$, gdzie $Z = \log C$. Zastosowana jako odwrotność $C = f^{-1}(Y)$, pozwala ona na obliczenie wielkości EC_x , w tym EC_{50} , EC_{10} i EC_{20} oraz ich 95 % granic ufności. Wykazano, że kilka prostych matematycznych postaci funkcyjnych z powodzeniem opisuje zależności stężenie-odpowieź uzyskiwane w badaniach inhibicji wzrostu glonów. Do funkcji tych należy, na przykład, równanie logarytmiczne, niesymetryczne równanie Weibula oraz funkcja rozkładu logarytmiczno-normalnego, z których wszystkie są krzywymi sigmoidalnymi dążącymi asymptotycznie do jedności dla $C \rightarrow 0$ oraz do zera dla $C \rightarrow$ nieskończoności.

Ostatnio zaproponowaną alternatywą dla modeli asymptotycznych jest zastosowanie modeli opartych na ciągłych funkcjach progowych (np. modelu Koymana „dla inhibicji wzrostu populacji”, Kooijman i inni, 1996). Model ten zakłada brak efektów przy stężeniach poniżej pewnego progu, EC_0+ , który oszacowywany jest przez ekstrapolację zależności odpowiedź-stężenie z wyznaczeniem przecięcia z osią stężeń przy użyciu prostej funkcji ciągłej, która nie jest różniczkowalna w punkcie początkowym.

Należy zwrócić uwagę, że analiza ta może być prostą minimalizacją sum kwadratów resztkowych (zakładając stałą wariancję) lub kwadratów ważonych, jeżeli ma być skompensowana heterogeniczność wariancji.

Procedura

Procedurę można przedstawić następująco: wybrać odpowiednie równanie funkcyjne, $Y = f(C)$, i dopasować je do danych za pomocą regresji nieliniowej. Najlepiej należy wykorzystać wyniki pomiarów z każdej indywidualnej kolby, zamiast średnich wartości replikatów, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji z danych. Jeśli natomiast wariancja jest duża, to praktyczne doświadczenie sugeruje, iż średnie wartości replikatów mogą okazać się solidniejszą estymacją matematyczną, mniej ulegającą wpływowi systematycznych błędów w danych, niż w przypadku zachowania każdego indywidualnego punktu danych.

Należy wykreślić dopasowaną krzywą i nanieść zmierzone dane i zbadać, czy dopasowanie krzywej jest odpowiednie. Szczególnie przydatnym narzędziem o tego celu może być analiza reszt. Jeżeli wybrana zależność funkcyjna do dopasowania odpowiedzi stężenia nie opisuje dobrze całej krzywej lub istotnej jej części, takiej jak odpowiedź przy niskich stężeniach, to należy wybrać inną możliwość dopasowania krzywej — np. krzywą niesymetryczną, taką jak funkcja Weibula, zamiast symetrycznej. Ujemne inhibicje mogą stanowić problem, na przykład z funkcją rozkładu logarytmiczno-normalnego,

również wymagając alternatywnej funkcji regresji. Nie jest zalecane, aby takim ujemnym wartościom przypisywać zerową lub małą dodatnią wartość, ponieważ zniekształca to rozkład błędów. Odpowiednim może być wykonanie oddzielnych dopasowań krzywej na częściach krzywej, takich jak część o małej inhibicji, aby oszacować wielkości $EC_{low\ x}$. Obliczyć z dopasowanego równania (za pomocą „odwrotnej estymacji”, $C = f^{-1}(Y)$) oszacowania punktów charakterystycznych EC_x i podać, jako minimum, oszacowanie EC_{50} oraz jedno lub dwa oszacowania $EC_{low\ x}$. Doświadczenie uzyskane z praktycznych badań wykazało, że dokładność badania glonów zwykle pozwala na dość dokładne oszacowanie na 10 % poziomie inhibicji, jeżeli istnieje dostateczna ilość punktów danych — o ile, jako czynnik wkładający, nie występuje stymulacja przy niskich stężeniach. Dokładność oszacowania EC_{20} jest często znacznie lepsza niż EC_{10} , ponieważ EC_{20} zazwyczaj leży na w przybliżeniu liniowej części środkowej krzywej odpowiedzi stężeniowej. Niekiedy EC_{10} może być trudne do interpretacji z powodu stymulacji wzrostu. Tak więc, choć EC_{10} zwykle da się uzyskać z dostateczną dokładnością, to również zaleca się, aby w sprawozdaniu zawsze podawać EC_{20} .

Współczynniki ważenia

Doświadczalna wariancja nie jest na ogół stała i zwykle zawiera składową proporcjonalną, korzystnie jest zatem rutynowo przeprowadzać regresję ważoną. Do takiej analizy przyjmuje się zazwyczaj współczynniki ważenia odwrotnie proporcjonalne do wariancji:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Wiele programów regresyjnych pozwala wykonywać opcję analizy regresji ważonej ze współczynnikami ważenia podanymi w tabeli. Dogodnie jest znormalizować współczynniki ważenia przez pomnożenie ich przez $n/\sum w_i$ (n jest liczbą punktów danych), tak aby ich suma równała się jedności.

Normalizowanie odpowiedzi

Normalizowanie przez średnią odpowiedź kontrolną stwarza pewne zasadnicze problemy i prowadzi do dość skomplikowanej struktury wariancji. Dzieląc odpowiedzi przez średnią odpowiedź kontrolną w celu uzyskania procentu inhibicji, wprowadza się dodatkowy błąd spowodowany błędem średniej kontrolnej. O ile błąd ten nie jest pomijalnie mały, współczynniki ważenia w regresji i granice ufności należy skorygować pod względem kowariancji za pomocą odpowiedzi kontrolnej (17). Należy zwrócić uwagę, że ważna jest wysoka dokładność oszacowanej średniej odpowiedzi kontrolnej, aby zminimalizować ogólną wariancję dla względnej odpowiedzi. Wariancja ta jest następująca:

dolny indeks i odnosi się do poziomu stężenia i a indeks dolny 0 do odpowiedzi kontrolnych)

$$Y_i = \text{Względna odpowiedź} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

z wariancją:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \partial (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

a ponieważ

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ i } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

mając dane o rozkładzie normalnym oraz m_i i m_0 replikatów:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

całkowita wariancja względnej odpowiedzi, Y_i , staje się zatem:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 m_0$$

Błąd średniej kontrolnej jest odwrotnie proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego z liczby uśrednionych replikatów kontrolnych i niekiedy może być uzasadnione ujęcie danych historycznych i w ten sposób znaczne zmniejszenie błędu. Alternatywna procedura polega nie na normalizowaniu danych i dopasowaniu bezwzględnych odpowiedzi, w tym danych odpowiedzi kontrolnych, lecz wprowadzeniu, jako dodatkowego parametru, wartości odpowiedzi kontrolnej, która będzie dopasowana za pomocą regresji nieliniowej. Przy zwykle 2-parametrowym równaniu regresji metoda ta stwarza konieczność dopasowania 3 parametrów, a przez to wymaga więcej punktów danych niż nieliniowa regresja danych, które są znormalizowane przy pomocy zadanej odpowiedzi kontrolnej.

Odwrotne przedziały ufności

Obliczanie przedziałów ufności regresji nieliniowej za pomocą odwrotnej estymacji jest dość złożone i nie jest dostępne jako opcja standardowa w zwykłych pakietach statystycznych programów komputerowych. Można otrzymać przybliżone granice ufności za pomocą standardowych programów regresji nieliniowej z reparametryzacją (Bruce i Versteeg, 1992), co polega na przepisaniu równania matematycznego z żądanymi oszacowaniami punktowymi, np. EC_{10} i EC_{50} , jako parametrami, które mają być oszacowane. (Weźmy funkcję $I = f(\alpha, \beta, \text{stężenie})$ i wykorzystajmy definicyjne zależności $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ i $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$, aby w miejsce $f(\alpha, \beta, \text{stężenie})$ podstawić równoważną funkcję $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{stężenie})$).

Bardziej bezpośrednie obliczenie (Andersen i inni, 1998) przeprowadza się, zachowując pierwotne równanie i stosując rozwinięcie w szereg Taylora wokół średnich r_i i r_0 .

Ostatnio popularne stały się „metody ładowania początkowego” („boot strap methods”). Metody takie wykorzystują zmierzone dane oraz częste powtórne próbkowanie kierowane generatorem liczb losowych do szacowania empirycznego rozkładu wariancji.

Literatura

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Env. Toxicol. Chem.*11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

ZAŁĄCZNIK V

C.25. MINERALIZACJA TLENOWA W WODZIE POWIERZCHNIOWEJ — SYMULACYJNE BADANIE BIODEGRADACJI

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. WSTĘP

Celem niniejszego badania jest zmierzenie czasowego przebiegu biodegradacji badanej substancji w małym stężeniu w napowietrzanej naturalnej wodzie oraz ilościowe wyrażenie wyników obserwacji w postaci wyrażenia szybkości w ujęciu kinetycznym. Niniejsze badanie symulacyjne jest laboratoryjną próbą prowadzoną w systemie okresowym, opartą na metodzie wstrząsanej kolby, mającą na celu wyznaczenie szybkości tlenowej biodegradacji substancji organicznych w próbkach naturalnej wody powierzchniowej (słodkiej, słonawej lub morskiej). Jest ono oparte na ISO/DIS 14592-1 (2) i zawiera również elementy zaczerpnięte w metod badawczych C.23 i C.24 (3)(4). Ewentualnie, przy długich czasach badania, prowadzenie badania w systemie okresowym zastępuje się prowadzeniem go w systemie półciągłym, aby nie dopuścić do pogorszenia się stanu mikrokosmosu. Zasadniczym celem symulacji jest określenie mineralizacji badanej substancji w wodzie powierzchniowej, przy czym mineralizacja stanowi podstawę do wyrażenia kinetyki degradacji. Jednakże dodatkowym drugorzędym celem badania jest uzyskanie informacji o pierwotnej degradacji oraz informacji o głównych produktach przemiany. Identyfikacja produktów przemiany oraz, jeśli to możliwe, ilościowe określenie ich stężeń, są szczególnie ważne w przypadku substancji, które bardzo wolno ulegają mineralizacji (np. przy półokresach zaniku dla całkowitego szczątkowego ^{14}C przekraczających 60 dni). Z powodu ograniczeń analitycznych do identyfikacji i ilościowego oznaczania głównych produktów przemiany zwykle należy używać wyższych stężeń badanej substancji (np. > 100 $\mu\text{g/l}$).

Niskie stężenie w niniejszym badaniu oznacza stężenie (np. mniejsze niż 1 $\mu\text{g/l}$ — 100 $\mu\text{g/l}$), które jest na tyle niskie, iż zapewnia, że kinetyka biodegradacji uzyskana w badaniu odzwierciedla kinetyki spodziewane w środowisku. W stosunku do całkowitej masy ulegających biodegradacji substratów węglowych dostępnych w naturalnej wodzie użytej do badania badana substancja obecna w niskim stężeniu posłuży jako drugorzędny substrat. Oznacza to, że spodziewana kinetyka biodegradacji jest kinetyką pierwszego rzędu („nierosnącą”) i że badana substancja może ulegać degradacji poprzez „kometabolizm”. Kinetyka pierwszego rzędu oznacza, iż szybkość degradacji (mg/l/dzień) jest proporcjonalna do stężenia substratu, które maleje w czasie. W przypadku rzeczywistej kinetyki pierwszego rzędu właściwa stała szybkości degradacji, k , jest niezależna od czasu i stężenia. Oznacza to, że k nie zmienia się znacząco w trakcie przebiegu doświadczenia i nie zmienia się wraz ze zwiększeniem stężenia pomiędzy doświadczeniami. Z definicji stała właściwej szybkości degradacji jest równa względnej zmianie stężenia przez czas $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Choć w zaleconych warunkach zwykle spodziewane są kinetyki pierwszego rzędu, to mogą istnieć pewne sytuacje, w których bardziej odpowiednie są inne kinetyki. Odchylenia od kinetyki pierwszego rzędu można obserwować np. wówczas, jeżeli szybkość biotransformacji jest ograniczana przez zjawiska związane z transportem masy, takie jak szybkość dyfuzji, a nie przez szybkość reakcji biologicznej. Jednakże dane można niemal zawsze opisać przy pomocy kinetyki pseudo pierwszego rzędu, przyjmując stałą szybkości zależną od stężenia.

Przed badaniem należy dysponować danymi o podatności na biodegradację badanej substancji w wyższych stężeniach (np. uzyskanymi ze standardowych prób przesiewowych), jak również danymi o podatności na degradację abiotyczną, produktach przemian oraz istotnych własnościach fizykochemicznych, w celu umożliwienia przeprowadzenia planowania doświadczeń oraz interpretacji wyników. Wyznaczenie podatności na ostateczną biodegradację umożliwia zastosowanie badanych substancji znakowanych za pomocą ^{14}C i określenie rozkładu fazy ^{14}C na końcu badania. Gdy użyta jest nieznakowana badana substancja, to ostateczną biodegradację można oszacować jedynie wówczas, jeśli badane jest wyższe stężenie i znane są wszystkie główne produkty przemiany.

1.2. DEFINICJE

Pierwotna biodegradacja: strukturalna zmiana (przemiana) substancji chemicznej przez mikroorganizmy, powodująca utratę chemicznej tożsamości.

Biodegradacja funkcjonalna: strukturalna zmiana (przemiana) substancji chemicznej przez mikroorganizmy, powodująca utratę określonej własności.

Ostateczna biodegradacja tlenowa: rozkład substancji chemicznej przez mikroorganizmy w obecności tlenu do dwutlenku węgla, wody i soli mineralnych wszelkich innych obecnych pierwiastków (mineralizacja) oraz wytworzenie nowej biomasy i produktów organicznych biosyntezy drobnoustrojowej.

Mineralizacja: rozkład substancji chemicznej lub materii organicznej przez mikroorganizmy w obecności tlenu do dwutlenku węgla, wody i soli mineralnych wszelkich innych obecnych pierwiastków.

Faza zastoju: czas od rozpoczęcia badania do osiągnięcia przystosowania się przez mikroorganizmy powodujące degradację oraz wzrostu stopnia biodegradacji substancji chemicznej lub materii organicznej do wykrywalnego poziomu (np. 10 % maksymalnej teoretycznej biodegradacji, bądź niższego, w zależności od dokładności techniki pomiarowej).

Maksymalny poziom biodegradacji: zapisany w procentach stopień biodegradacji substancji chemicznej lub materii organicznej podczas badania, powyżej którego nie następuje dalsza biodegradacja w trakcie badania.

Podstawowy substrat: zbiór naturalnych źródeł węgla i energii, które zapewniają wzrost i utrzymanie biomasy drobnoustrojowej.

Drugorzędny substrat: składnik substratowy obecny w tak niskim stężeniu, iż wskutek jego degradacji właściwym mikroorganizmom dostarczane są jedynie nieznaczne ilości węgla i energii w porównaniu do ilości węgla i energii dostarczanych w wyniku degradacji głównych składników substratowych (podstawowych substratów).

Stała szybkości degradacji: kinetyczna stała szybkości pierwszego rzędu lub pseudo pierwszego rzędu, k (d^{-1}), która wskazuje szybkość procesów biodegradacji. Dla doświadczenia prowadzonego okresowo k oszacowuje się na podstawie początkowej części krzywej biodegradacji uzyskanej po końcu fazy opóźnienia.

Czas półtrwania, $t_{1/2}$ (d): termin używany do charakteryzowania szybkości reakcji pierwszego rzędu. Jest to przedział czasu, który odpowiada zmniejszeniu się stężenia o czynnik 2. Czas półtrwania i stała szybkości biodegradacji związane są równaniem $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Półokres degradacji, DT_{50} (d): termin używany do ilościowego wyrażenia wyniku badań biodegradacji. Jest to przedział czasu, wraz z fazą opóźnienia, potrzebny do osiągnięcia wartości biodegradacji wynoszącej 50 %.

Granica wykrywalności (LOD) i granica kwantyfikacji (LOQ): granica wykrywalności (LOD) jest to stężenie substancji, poniżej którego tożsamości substancji nie można odróżnić od ubocznych efektów analitycznych. Granica kwantyfikacji (LOQ) jest to stężenie substancji, poniżej którego stężenia nie można oznaczyć z zadowalającą dokładnością.

Rozpuszczony węgiel organiczny (RWO): ta część węgla organicznego w próbce wody, której nie można usunąć za pomocą określonej metody rozdzielania faz, na przykład poprzez odwirowanie przy 40 000 ms^{-2} przez 15 min lub przez filtrację przepionową z użyciem przepion o średnicy porów 0,2 μm –0,45 μm .

Aktywność całkowitego organicznego ^{14}C (TOA): całkowita aktywność ^{14}C związana z węglem organicznym.

Aktywność rozpuszczonego organicznego ^{14}C (DOA): całkowita aktywność ^{14}C związana z rozpuszczonym węglem organicznym.

Aktywność organicznego ^{14}C w postaci cząstek stałych (POA): całkowita aktywność ^{14}C związana z węglem organicznym w postaci cząstek stałych.

1.3. STOSOWALNOŚĆ BADANIA

Niniejsze badanie symulacyjne stosuje się do nielotnych lub nieznacznie lotnych substancji organicznych badanych w niskich stężeniach. Gdy używa się kolb otwartych do atmosfery (np. zamkniętych wata), to substancje o stałych prawa Henry'ego mniejszych niż około 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ok. $10^{-5} atm \cdot m^3/mol$) można w praktyce uważać za nielotne. Gdy używa się zamkniętych kolb z przestrzenią nad roztworem, to możliwe jest badanie nieznacznie lotnych substancji (o stałych prawa Henry'ego $< 100 Pa \cdot m^3/mol$ lub $< 10^{-3} atm \cdot m^3/mol$) bez strat z układu próbnego. Strata substancji znakowanych przy pomocy ^{14}C może wystąpić, jeśli nie zachowuje się prawidłowych środków ostrożności podczas usuwania CO_2 . W takich sytuacjach może być konieczne wychwycenie CO_2 w wewnętrznym absorberze z alkaliem lub użycie zewnętrznego układu absorbera CO_2 (bezpośrednie oznaczenie $^{14}CO_2$; zob. dodatek 3). Do wyznaczenia kinetyki biodegradacji, stężenia badanej substancji muszą być niższe od jej rozpuszczalności w wodzie. Należy zwrócić uwagę jednak, że literaturowe wartości rozpuszczalności w wodzie mogą być znacznie wyższe niż rozpuszczalność badanej substancji w naturalnych wodach. Ewentualnie rozpuszczalność badanych substancji szczególnie trudno rozpuszczalnych w wodzie można ustalić przy użyciu naturalnych wód.

Metoda może być stosowana do symulowania biodegradacji w wodzie powierzchniowej wolnej od dużych cząstek („próba pelagiczna”) lub w mętnej wodzie powierzchniowej, która może istnieć np. w pobliżu granicy faz woda/osad („próba z zawieszonym osadem”).

1.4. ZASADA BADANIA

Badanie przeprowadza się w systemie okresowym przez inkubowanie badanej substancji samą wodą powierzchniową („próba pelagiczna”) lub wodą powierzchniową doprawioną zawieszonymi cząstkami stałymi/osadem w ilości 0,01–1 g/l suchej masy („próba z zawieszonym osadem”), symulując zbiornik wodny z zawieszonymi cząstkami stałymi lub ponownie zawieszonym osadem. Stężenie zawieszonych cząstek stałych/osadu w dolnym zakresie tego przedziału jest typowe dla większości wód powierzchniowych. Kolby próbne inkubuje się w ciemności w temperaturze środowiska w warunkach aerobowych, stosując mieszanie. W celu określenia kinetyki degradacji należy użyć co najmniej dwóch różnych stężeń badanej substancji. Stężenia powinny różnić się od siebie o czynnik 5–10 i powinny reprezentować spodziewany zakres stężeń w środowisku. Maksymalne stężenie badanej substancji nie powinno przekraczać 100 µg/l, lecz aby zapewnić, że biodegradacja będzie przebiegać zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu preferowane jest stężenie wynoszące 10 µg/l lub mniej. Najniższe stężenie nie powinno przekraczać 10 µg/l, lecz preferowane są niższe stężenia próbne, wynoszące 1–2 µg/l lub poniżej 1 µg/l. Zwykle zadowalającą analizę tak niskich stężeń można wykonać, używając dostępnych w handlu substancji znakowanych za pomocą ^{14}C . Z uwagi na ograniczenia analityczne często niemożliwe jest zmierzenie stężenia badanej substancji z wymaganą dokładnością, jeżeli badana substancja jest zastosowana w stężeniu ≤ 100 µg/l (zob. akapit drugi w sekcji 1.7.2). Do identyfikacji i ilościowego oznaczenia głównych produktów przemiany lub wówczas, gdy nie jest dostępna konkretna metoda analityczna o niskiej granicy wykrywania, mogą być stosowane wyższe stężenia badanej substancji (> 100 µg/l, a niekiedy > 1 mg/l). Jeżeli badane są wysokie stężenia badanej substancji, to może być niemożliwe wykorzystanie wyników do oszacowania stałej i czasu półtrwania degradacji pierwszego rzędu, gdyż degradacja prawdopodobnie nie będzie przebiegać zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu.

Degradację śledzi się w odpowiednich odstępach czasu, mierząc resztkowy ^{14}C lub stężenie resztkowe badanej substancji, gdy stosowana jest specyficzna analiza chemiczna. Oznakowanie za pomocą ^{14}C najbardziej trwałej części cząsteczki zapewnia wyznaczenie całkowitej mineralizacji, podczas gdy oznakowanie przy pomocy ^{14}C mniej trwałej części cząsteczki, jak również zastosowanie specyficznej analizy, umożliwia ocenę jedynie biodegradacji pierwotnej. Jednakże najbardziej trwała część cząsteczki niekoniecznie obejmuje właściwą funkcjonalną część cząsteczki (którą można powiązać z określoną własnością, taką jak toksyczność, bioakumulacja, itp.). W tej sytuacji, aby śledzić eliminację określonej własności, stosowne może być wykorzystanie badanej substancji, która jest oznakowana za pomocą ^{14}C w części funkcjonalnej.

1.5. INFORMACJE O BADANEJ SUBSTANCJI

Do niniejszego badania mogą być używane substancje próbne zarówno znakowane, jak i nieznakowane izotopem promieniotwórczym. Zalecana jest technika znakowania za pomocą ^{14}C i znakowanie zwykle powinno być wykonane w najbardziej trwałej części(-ach) cząsteczki (zob. również — sekcja 1.4). W przypadku substancji zawierających więcej niż jeden pierścień aromatyczny, najlepiej jeden lub więcej atomów węgla w każdym pierścieniu powinno być oznakowanych za pomocą ^{14}C . Ponadto, najkorzystniej jest, jeśli za pomocą ^{14}C oznakowany jest jeden lub więcej atomów węgla po obydwu stronach wiązań łatwo ulegających degradacji. Chemiczna i/lub radiochemiczna czystość badanej substancji powinna wynosić > 95 %. Dla substancji znakowanych izotopem promieniotwórczym, preferowana jest aktywność właściwa wynosząca ok. 50 µCi/mg (1,85 MBq) lub więcej, aby ułatwić pomiary ^{14}C w badaniach prowadzonych przy niskich początkowych stężeniach. Powinny być dostępne następujące dane o badanej substancji:

- rozpuszczalność w wodzie [metoda A.6],
- rozpuszczalność w organicznym rozpuszczalniku(-ach) (substancje stosowane z rozpuszczalnikiem lub substancje o niskiej rozpuszczalności w wodzie),
- stała dysocjacji (pKa), jeżeli substancja jest podatna na protonację lub deprotonację [OECD TG 112] (5),
- ciśnienie pary [metoda A.4] oraz stała prawa Henry’ego,
- chemiczna trwałość w wodzie i w ciemności (hydroliza) [metoda C.7].

Gdy słabo rozpuszczalne w wodzie substancje są badane w wodzie morskiej, to może być przydatna znajomość stałej wysalania (lub stałej „Setczenowa”) K^s , którą określa wyrażenie: $\log(S/S') = K^s C_m$, w którym S i S' jest rozpuszczalnością, odpowiednio, w wodzie słodkiej i w wodzie morskiej, a C_m stężeniem molowym soli.

Jeżeli badanie przeprowadza się jako „próbę zawieszzonego osadu”, to powinny być również dostępne następujące dane:

- współczynnik podziału n-oktanol/woda [metoda A.8],
- współczynnik adsorpcji [metoda C.18].

Do innych przydatnych danych mogą należeć:

- stężenie w środowisku, jeśli jest znane lub oszacowane,
- toksyczność badanej substancji w stosunku do mikroorganizmów [metoda C.11],
- gotowa i/lub naturalna podatność na biodegradację [metody C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],
- podatność na aerobową lub anaerobową biodegradację w badaniach przemiany w glebie i osadzie/wodzie [metody C.23, C.24].

1.6. SUBSTANCJA ODNIESIENIA

Jako substancję odniesienia należy zastosować substancję, która normalnie łatwo ulega degradacji w warunkach aerobowych (tj. anilinę lub benzoesan sodu). Spodziewany okres dla degradacji aniliny i benzoesu sodu wynosi zwykle mniej niż 2 tygodnie. Zadaniem substancji odniesienia jest zapewnienie, że aktywność drobnoustrojowa wody zawiera się w pewnych granicach, tzn. że woda zawiera aktywną populację drobnoustrojów.

1.7. KRYTERIA JAKOŚCI

1.7.1. Odzysk

Natychmiast po dodaniu badanej substancji każde początkowe stężenie należy sprawdzić poprzez pomiary aktywności ^{14}C lub, w przypadku nieznakowanych substancji, za pomocą analiz chemicznych, w co najmniej podwójnych próbkach. Dostarcza to informacji o stosowności i powtarzalności metody analitycznej oraz o jednorodności rozkładu badanej substancji. Zwykle w późniejszych analizach danych używa się zmierzonej początkowej aktywności ^{14}C lub stężenia badanej substancji zamiast nominalnego stężenia, gdyż w ten sposób kompensuje się straty spowodowane sorpcją i błędami dozowania. Dla substancji znakowanej za pomocą ^{14}C poziom odzysku na końcu doświadczenia dany jest przez bilans masy (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.4). Najlepiej jest, jeśli bilans masy znakowanej izotopem promieniotwórczym zawiera się w granicach 90–110 %, natomiast dla nieznakowanych badanych substancji dokładność analityczna powinna prowadzić do początkowego odzysku wynoszącego 70–110 %. Zakresy te należy interpretować jako docelowe i nie należy używać ich jako kryteriów dla przyjęcia badania. Ewentualnie dokładność analityczną można wyznaczyć dla badanej substancji w niższym stężeniu niż początkowe stężenie oraz dla głównych produktów przemiany.

1.7.2. Powtarzalność i czułość metody analitycznej

Powtarzalność metody analitycznej (w tym wydajność początkowej ekstrakcji) w ilościowym oznaczaniu badanej substancji oraz produktów przemiany, jeśli stosowne, należy sprawdzić za pomocą pięciu powtórzonych analiz indywidualnych ekstraktów wody powierzchniowej.

Granica wykrywalności (LOD) metody analitycznej dla badanej substancji i dla produktów przemiany powinna wynosić co najmniej 1 % początkowej ilości wprowadzonej do badanego układu, jeśli to możliwe. Granica kwantyfikacji (LOQ) powinna być mniejsza lub równa 10 % zastosowanego stężenia. Analizy chemiczne wielu substancji organicznych i produktów ich przemiany często wymagają, aby badana substancja była wprowadzona w stosunkowo dużym stężeniu, tj. > 100 µg/l.

1.8. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.8.1. Sprzęt

Badanie można prowadzić w kolbach stożkowych lub cylindrycznych o odpowiedniej pojemności (np. 0,5 lub 1,0 litra) zamkniętych korkiem silikonowym lub gumowym bądź w kolbach na surowicę z wieczkami szczelnymi dla CO_2 (np. przykrywkami z gumy butylowej). Inną możliwością jest prowadzenie badania przy użyciu wielu kolb i zbieranie całych kolb, co najmniej podwójnie, o każdym czasie przewidzianym na pobranie próbki (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.1). Dla nielotnych badanych substancji, które nie są oznakowane izotopem promieniotwórczym, nie są wymagane gazoszczelne korki lub przykrywki; odpowiednie są luźne tampony z waty, które zapobiegają zanieczyszczeniu z powietrza (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.9.1). Nieznacznie lotne substancje

należy badać w układzie typu biometr z łagodnym mieszaniem powierzchni wody. Aby być pewnym, że nie występuje zanieczyszczenie bakteryjne, przed użyciem naczynia można dodatkowo wysterylizować przez ogrzanie lub autoklawizowanie. Ponadto używany jest następujący standardowy sprzęt laboratoryjny:

- stół wibracyjny lub mieszadła magnetyczne do ciągłego mieszania kolb próbnych,
- wirówka,
- pehametr,
- turbidymetr do nefelometrycznych pomiarów zmętnienia,
- piec lub kuchenka mikrofalowa do oznaczeń masy suchej,
- aparat do filtracji przeponowej,
- autoklaw lub piec do sterylizacji szkła laboratoryjnego,
- urządzenia do manipulacji substancjami oznakowanymi przy pomocy ^{14}C ,
- sprzęt do ilościowego określania aktywności ^{14}C w próbkach pobranych z roztworów wychwytyjących CO_2 oraz, jeśli to wymagane, w próbkach osadu,
- sprzęt analityczny do oznaczania badanej substancji (i substancji odniesienia), jeżeli stosowana jest specyficzna analiza chemiczna (np. chromatograf gazowy, wysokociśnieniowy chromatograf cieczowy).

1.8.2. **Roztwory wzorcowe badanej substancji**

Do sporządzenia roztworów podstawowych badanej substancji i substancji odniesienia używa się wody dejonizowanej (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.7). Woda dejonizowana powinna być wolna od substancji, które mogą być toksyczne dla mikroorganizmów, zaś stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (RWO) nie powinno być większe niż 1 mg/l (6).

1.8.3. **Pobranie i transport wody powierzchniowej**

Miejsce do pobrania próbki wody powierzchniowej należy wybrać stosownie do celu badania w danej sytuacji. Przy wyborze miejsc do pobrania próbki należy wziąć pod uwagę historię możliwych wprowadzanych zanieczyszczeń rolniczych, przemysłowych lub domowych. Jeżeli wiadomo, że środowisko wodne było zanieczyszczane badaną substancją lub jej strukturalnymi analogami w ciągu poprzednich czterech lat, to nie należy go wykorzystywać do pobrania wody do badania, chyba że wyraźnym celem badacza jest zbadanie szybkości degradacji w poprzednio ekspozycyjnych miejscach. W miejscu pobrania należy zmierzyć pH i temperaturę wody. Ponadto należy odnotować głębokość pobierania próbki oraz wygląd próbki wody (np. barwę i mętność) (zob. sekcja 3). Należy zmierzyć stężenie tlenu i/lub potencjał redoks w wodzie i w powierzchniowej warstwie osadu, aby wykazać istnienie warunków aerobowe, chyba że jest to oczywiste na podstawie oceny wyglądu i historycznych doświadczeń dotyczących miejsca. Wodę powierzchniową należy transportować w dokładnie wyczyszczonym pojemniku. Podczas transportu, temperatura próbki nie powinna znacząco przekraczać temperatury stosowanej w badaniu. Zalecane jest ochłodzenie do temperatury 4 °C, jeśli czas trwania transportu przekracza 2–3 godziny. Probki wody nie wolno zamrażać.

1.8.4. **Przechowywanie i przygotowywanie wody powierzchniowej**

Badanie najlepiej jest rozpocząć w ciągu jednego dnia od pobrania próbki. Przechowywanie wody, jeśli konieczne, powinno być ograniczone do minimum i w żadnym wypadku nie może przekroczyć maksymalnego okresu wynoszącego 4 tygodnie. Do czasu użycia próbkę wody należy utrzymywać w temperaturze 4 °C z napowietrzaniem. Przed użyciem należy usunąć duże cząstki, np. za pomocą filtracji przez filtr nylonowy o rozmiarze otworów 100 µm lub przez zgrubny filtr papierowy bądź poprzez sedymentację.

1.8.5. **Sporządzenie wody doprawionej osadem (do wyboru)**

Do próby zawieszonego osadu do kolb zawierających naturalną wodę (przefiltrowaną w celu usunięcia dużych cząstek, jak opisano w sekcji 1.8.4) dodaje się osad powierzchniowy, aby uzyskać zawiesinę; stężenie zawieszonych cząstek stałych powinno zawierać się w granicach 0,01–1 g/l. Osad powierzchniowy powinien pochodzić z tego samego miejsca, z którego pobrano próbkę wody. W zależności od konkretnego środowiska wodnego osad powierzchniowy może charakteryzować się wysoką zawartością węgla organicznego (2,5–7,5 %) i drobnoziarnistą strukturą lub niską zawartością węgla organicznego (0,5–2,5 %) i gruboziarnistą strukturą (3). Osad powierzchniowy można przygotować następująco: pobrać kilka rdzeni osadu, używając rurki z przezroczystego tworzywa

sztywnego, natychmiast po pobraniu próbek odciąć górne warstwy aerobowe (od powierzchni do głębokości maks. 5 mm) i połączyć je z sobą. Otrzymaną w wyniku próbkę osadu należy przetransportować w pojemniku z dużą objętością powietrza nad osadem, aby utrzymać osad w warunkach aerobowych (ochłodzić do temperatury 4 °C, jeśli czas transportu przekracza 2–3 godziny). Z próbki osadu należy sporządzić zawiesinę w badanej wodzie w stosunku 1:10 i do czasu użycia utrzymywać w temperaturze 4 °C z napowietrzaniem. Przechowywanie osadu, jeśli jest wymagane, powinno być ograniczone do minimum i w żadnym wypadku nie może przekroczyć maksymalnego okresu wynoszącego 4 tygodnie.

1.8.6. Procedura półciągła (do wyboru)

Jeśli występuje długa zwłoka czasowa, to może być wymagana dłuższa inkubacja (trwająca kilka miesięcy), zanim można będzie zmierzyć znaczącą degradację badanej substancji. Jeśli wiadomo o tym z poprzedniego badania substancji, to badanie można rozpocząć, stosując procedurę półciąglą, która pozwala na okresową wymianę części badanej wody lub zawiesiny (zob. dodatek 2). Alternatywnie normalne badanie prowadzone w systemie okresowym można zamienić na badanie półciągłe, jeśli nie została osiągnięta degradacja badanej substancji w ciągu około 60 dni badania z użyciem procedury okresowej (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.8.3).

1.8.7. Dodanie substancji badanej (lub odniesienia)

W przypadku substancji o wysokiej rozpuszczalności w wodzie ($> 1 \text{ mg/L}$) i małej lotności (stałe prawa Henry'ego $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ lub $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) roztwór podstawowy można sporządzić w wodzie dejonizowanej (zob. sekcja 1.8.2); odpowiednią objętość roztworu podstawowego dodaje się do naczyń próbnych, aby uzyskać żądane stężenie. Objętość każdego dodawanego roztworu podstawowego należy ograniczyć do praktycznie możliwego minimum ($< 10\%$ końcowej objętości cieczy, jeśli to możliwe). Inna procedura polega na rozpuszczeniu badanej substancji w dużej objętości badanej wody, co można uważać za procedurę alternatywną dla użycia rozpuszczalników organicznych.

Jeśli to nieuniknione, roztwory podstawowe nielotnych substancji o słabej rozpuszczalności w wodzie należy sporządzić przy użyciu lotnego rozpuszczalnika organicznego, lecz ilość rozpuszczalnika dodanego do układu nie powinna przekraczać 1% obj. i nie powinna mieć negatywnych wpływów na aktywność drobnoustrojów. Rozpuszczalnik nie powinien wpływać na stabilność badanej substancji w wodzie. Rozpuszczalnik należy ograniczyć do bardzo małej ilości, tak aby nie zwiększył znacząco stężenia RWO w badanej wodzie lub zawiesinie. Należy to sprawdzić za pomocą analizy specyficznej dla substancji lub, jeśli to możliwe, za pomocą analizy RWO (6). Należy starać się ograniczyć ilość przenoszonego rozpuszczalnika do absolutnie niezbędnej wielkości oraz upewnić się, że ilość badanej substancji może rozpuścić się w końcowej objętości badanej wody. Do wprowadzenia badanej substancji do naczyń próbnych można użyć innych technik, takich jak opisane w (7) i (8). Gdy do wprowadzenia badanej substancji użyty jest rozpuszczalnik organiczny, to próby z rozpuszczalnikiem zawierające badaną wodę (bez dodatków) i badaną wodę z dodatkiem substancji odniesienia należy potraktować podobnie, jak aktywne naczynia próbne zaprawione badaną substancją w nośniku rozpuszczalnikowym. Celem użycia prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem jest zbadanie możliwych ujemnych skutków powodowanych przez rozpuszczalnik w populacji mikroorganizmów, uwidocznionych przez degradację substancji odniesienia.

1.8.8. Warunki badania

1.8.8.1. Temperatura badania

Inkubacja powinna odbywać się w ciemności (preferowane) lub w rozproszonym świetle w regulowanej temperaturze ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), którą może być temperatura polowa lub standardowa temperatura 20–25 °C. Temperaturą polową może być rzeczywista temperatura próbki w czasie jej pobierania lub średnia temperatura otoczenia w miejscu pobierania próbki.

1.8.8.2. Mieszanie

Należy zapewnić mieszanie poprzez ciągle wstrząsanie lub mieszanie, aby utrzymać cząstki i mikroorganizmy w zawiesinie. Mieszanie ułatwia również przenoszenie tlenu z przestrzeni nad cieczą do cieczy, tak aby mogły być należycie utrzymane warunki aerobowe. Ustawić kolby na stole wibracyjnym (z prędkością mieszania ok. 100 obr./min) lub użyć mieszadła magnetycznego. Mieszanie musi być ciągłe. Jednakże wstrząsanie lub mieszanie powinno być możliwie jak najbardziej łagodne, przy jednoczesnym utrzymywaniu jednorodnej zawiesiny.

1.8.8.3. Czas trwania badania

Czas trwania badania zwykle nie powinien przekraczać 60 dni, chyba że zastosowana jest procedura półciągła z okresową wymianą badanej zawiesiny (zob. sekcja 1.8.6 i dodatek 2). Jednakże okres badania w przypadku próby okresowej może być przedłużony do 90 dni, jeżeli degradacja badanej substancji rozpoczęła się w ciągu pierwszych 60 dni. Degradację monitoruje się w odpowiednich odstępach czasu poprzez wyznaczanie aktywności resztkowego ^{14}C lub wydzielonego $^{14}\text{CO}_2$ (zob. sekcja 1.8.9.4) i/lub za pomocą analizy chemicznej (sekcja 1.8.9.5). Czas inkubacji musi być wystarczająco długi, aby ocenić proces degradacji. Stopień degradacji najlepiej powinien przekraczać 50 %; w przypadku substancji powoli ulegających degradacji, stopień degradacji musi być dostateczny (zwykle większy niż 20 % degradacji), aby zapewnić oszacowanie kinetycznej stałej szybkości degradacji.

Należy prowadzić okresowe pomiary pH i stężenia tlenu w układzie, chyba że poprzednie doświadczenia uzyskane z podobnych badań z udziałem próbek wody i osadu pobranych z tego samego miejsca wskazują, że pomiary takie są niepotrzebne. W pewnych warunkach może zdarzyć się, że metabolizm podstawowych substratów przy znacznie wyższych stężeniach w wodzie lub osadzie spowoduje na tyle duże wydzielenie się CO_2 i wyczerpanie się tlenu, że znacząco zmienią warunki doświadczalne podczas badania.

1.8.9. Procedura

1.8.9.1. Przygotowanie kolb do próby pelagicznej

Przenieść odpowiednią objętość badanej wody do kolb próbnych do około jednej trzeciej objętości kolby, ale nie mniej niż około 100 ml. Jeżeli użytych jest wiele kolb (w celu umożliwienia zebrania całych kolb o każdym czasie pobierania próbek), to odpowiednia objętość badanej wody również wynosi około 100 ml, gdyż małe objętości próbek mogą wpływać na długość fazy zastoju. Badaną substancję dodaje się z roztworu podstawowego, jak opisano w sekcjach 1.8.2 i 1.8.7. Należy użyć co najmniej dwóch różnych stężeń badanej substancji, różniących się o czynnik 5–10, aby określić kinetykę degradacji i obliczyć kinetyczną stałą szybkości degradacji. Obydwa wybrane stężenia powinny być mniejsze niż 100 $\mu\text{g/l}$, a najlepiej powinny zawierać się w przedziale < 1–10 $\mu\text{g/l}$.

Zamknąć kolby korkami lub przykrywkami nieprzepuszczalnymi dla powietrza i CO_2 . Dla nieznakowanych za pomocą ^{14}C nietlotnych badanych substancji chemicznych odpowiednie są luźne tampony z waty, które zapobiegają przedostawaniu się zanieczyszczeń z powietrza (zob. sekcja 1.8.1), pod warunkiem iż wiadomo, że wszelkie główne produkty degradacji są nietlotne i jeżeli stosowane jest bezpośrednie oznaczanie CO_2 (zob. dodatek 3).

Inkubować kolby w wybranej temperaturze (zob. sekcja 1.8.8.1). Pobrać próbki do analizy chemicznej lub pomiarów ^{14}C na początku badania (tj. przed rozpoczęciem się biodegradacji; zob. sekcja 1.7.1), a następnie w odpowiednich odstępach czasu w trakcie przebiegu badania. Próbkowanie można przeprowadzić przez pobranie podpróbek (np. porcji po 5 ml) z każdego replikatu lub przez zebranie całych kolb o każdym czasie próbkowania. Mineralizację badanej substancji można określić pośrednio lub bezpośrednio (zob. dodatek 3). Zwykle podczas fazy degradacji (tj. po zakończeniu fazy zastoju) wymaganych jest minimum pięć punktów próbkowania w celu oszacowania wiarygodnej stałej szybkości, chyba że można uzasadnić, iż dla substancji szybko ulegających degradacji wystarczą trzy punkty próbkowania. W przypadku substancji, które nie ulegają szybko degradacji, można z łatwością wykonać większą ilość pomiarów podczas fazy degradacji i dlatego do oszacowania k należy użyć więcej punktów danych. Nie można podać ustalonego harmonogramu pobierania próbek, gdyż szybkość biodegradacji jest zmienna; jednakże zaleca się, aby pobrać próbkę raz na tydzień, jeśli degradacja jest powolna. Jeżeli badana substancja szybko ulega degradacji, to pobranie próbki powinno odbywać się raz na dzień w ciągu pierwszych trzech dni, a następnie co dwa lub trzy dni. W niektórych sytuacjach, jak na przykład w przypadku substancji szybko hydrolizujących, może być konieczne pobieranie próbek w odstępach godzinnych. Zaleca się, aby przed badaniem przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia odpowiednich odstępów próbkowania. Jeżeli próbki muszą być dostępne do dalszej specjalnej analizy, to wskazane jest, aby pobrać większą ilość próbek, a następnie wybrać te, które będą analizowane na końcu doświadczenia, postępując według strategii „wstecz”, zgodnie z którą ostatnie próbki są analizowane jako pierwsze (zob. akapit drugi w sekcji 1.8.9.5, gdzie podano wskazówki dotyczące trwałości próbek w czasie przechowywania).

1.8.9.2. Liczba kolb i próbek

Przygotować dostateczną ilość kolb próbnych, tak aby mieć:

- kolby próbne; co najmniej po dwie kolby do każdego stężenia badanej substancji (najlepiej minimum 3) lub wiele kolb próbnych do każdego stężenia, jeżeli o każdym czasie próbkowania zbierane są całe kolby (symbol F_T),
- kolby próbne do obliczenia bilansu masy; co najmniej po dwie kolby do każdego badanego stężenia (symbol F_M),

- ślepią próbę kontrolną, bez badanej substancji; co najmniej jedną kolbę próbną zawierającą tylko badaną wodę (symbol F_B),
- porównawczą próbę kontrolną; po dwie kolby z substancją odniesienia (np. aniliną lub benzoesanem sodu, o stężeniu 10 µg/l) (symbol F_C). Celem porównawczej próby kontrolnej jest potwierdzenie minimalnej aktywności drobnoustrojów. Jeśli jest to dogodne, można użyć substancji odniesienia znakowanej izotopem promieniotwórczym, także wówczas, gdy degradacja badanej substancji jest monitorowana za pomocą analiz chemicznych,
- sterylną próbę kontrolną; jedną lub dwie kolby zawierające wysterylizowaną badaną wodę do zbadania możliwej abiotycznej degradacji lub innego niebiologicznego usuwania badanej substancji (symbol F_S). Biologiczną aktywność można zatrzymać przez autoklawizowanie badanej wody (121 °C; 20 min) lub przez dodanie środka toksycznego (np. azydku sodowego (NaN₃) o stężeniu 10–20 g/l, chlorku rtęciowego (HgCl₂) o stężeniu 100 mg/l lub formaliny o stężeniu 100 mg/l) bądź przez napromieniowanie promieniami gamma. Jeżeli wykorzystuje się HgCl₂, to należy go zutylizować, tak jak odpad toksyczny. W przypadku wody z osadem dodanym w dużej ilości nie jest łatwo uzyskać sterylne warunki; w takim przypadku zaleca się kilkukrotne (np. trzykrotne) autoklawizowanie. Należy wziąć pod uwagę, że wskutek autoklawizowania może zmienić się charakterystyka sorpcyjna osadu,
- próby kontrolne z rozpuszczalnikiem, zawierające badaną wodę oraz badaną wodę z substancją odniesienia; po dwie kolby potraktowane taką samą ilością rozpuszczalnika i przy zastosowaniu takiej samej procedury, jak użyta do wprowadzania badanej substancji. Celem jest zbadanie możliwych negatywnych wpływów rozpuszczalnika przez określenie degradacji badanej substancji.

W planie badania badacz powinien wziąć pod uwagę względne znaczenie zwiększonej ilości powtórzeń doświadczalnych w zależności od zwiększonej krotności próbkowania. Dokładna liczba potrzebnych kolb zależy będzie od metody użytej do mierzenia degradacji (zob. akapit trzeci w sekcji 1.8.9.1; sekcja 1.8.9.4 i dodatek 3).

O każdym czasie próbkowania, z każdej kolby próbnej należy pobrać dwie podpróbki (np. porcje po 5 ml). Jeżeli używa się wielu kolb dla umożliwienia zbierania całych kolb, to każdorazowo podczas próbkowania należy poświęcić minimum dwie kolby (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.1).

1.8.9.3. Przygotowanie kolb do próby z zawieszonym osadem [do wyboru]

Dodać do naczyń próbnych niezbędne objętości badanej wody i osadu, jeśli jest wymagany (zob. sekcja 1.8.5). Przygotowanie kolb do próby z zawieszonym osadem jest takie samo, jak dla próby pelagicznej (zob. sekcje 1.8.9.1 i 1.8.9.2). Najlepiej jest użyć butelek na osocze lub kolb o podobnym kształcie. Umieścić zamknięte kolby poziomo na wstrząsarce. Oczywiście otwarte kolby w przypadku nielotnych substancji nieznakowanych za pomocą ¹⁴C należy ustawić w pozycji pionowej; w tym przypadku zaleca się mieszanie magnetyczne i użycie mieszadełek magnetycznych pokrytych szkłem. Jeśli to konieczne, napowietrzać butelki, aby utrzymać odpowiednie warunki aerobowe.

1.8.9.4. Oznaczenia radiochemiczne

Wydzielający się ¹⁴CO₂ mierzy się pośrednio i bezpośrednio (zob. dodatek 3). ¹⁴CO₂ oznacza się pośrednio na podstawie różnicy pomiędzy początkową aktywnością ¹⁴C w badanej wodzie lub zawiesinie a całkowitą aktywnością resztkową podczas pobierania próbek, zmierzoną po zakwaszeniu próbki do pH 2–3 i usunięciu CO₂. Węgiel nieorganiczny zostaje w ten sposób usunięty, a zmierzona aktywność resztkowa pochodzi od materiału organicznego. Pośredniego oznaczania ¹⁴CO₂ nie należy stosować, jeżeli podczas przemiany badanej substancji tworzą się główne produkty przemiany, które są lotne (zob. dodatek 3). Jeśli to możliwe, wydzielenie ¹⁴CO₂ należy zmierzyć bezpośrednio (zob. dodatek 3) podczas pobierania próbek w co najmniej jednej kolbie próbnej; procedura ta umożliwia sprawdzenie zarówno bilansu masy, jak i procesu biodegradacji, lecz ogranicza się do prób prowadzonych z zamkniętymi kolbami.

Jeżeli wydzielony ¹⁴CO₂ mierzy się bezpośrednio podczas badania, to w tym celu na początku badania należy przygotować większą ilość kolb. Bezpośrednie oznaczanie ¹⁴CO₂ jest zalecane, jeżeli podczas przemiany badanej substancji tworzą się lotne główne produkty przemiany. W każdym momencie pomiaru dodatkowe kolby próbne zakwasza się do pH 2–3, a ¹⁴CO₂ zbiera się w wewnętrznym lub zewnętrznym absorberze (zob. dodatek 3).

Ewentualnie, badaną substancję znakowaną za pomocą ¹⁴C oraz główne produkty przemiany można oznaczać przy zastosowaniu radiochromatografii (np. chromatografii cienkowarstwowej, RAD-TLC) lub HPLC z detekcją radiochemiczną.

Ewentualnie można wyznaczyć rozkład fazowy pozostającej radioaktywności (zob. dodatek 1) oraz resztkowej badanej substancji i produktów przemiany.

Na końcu badania należy wyznaczyć bilans masy przez bezpośredni pomiar $^{14}\text{CO}_2$, używając oddzielnych kolb próbnych, z których próbki nie są pobierane w trakcie badania (zob. dodatek 3).

1.8.9.5. *Specyficzna analiza chemiczna*

Jeśli dysponuje się czułą specyficzną metodą analityczną, to pierwotną biodegradację można ocenić, mierząc całkowite resztkowe stężenie badanej substancji, zamiast używania technik znakowania izotopem promieniotwórczym. Jeżeli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym (w celu zmierzenia całkowitej mineralizacji), to równoległe można wykonać specyficzną analizę chemiczną, aby uzyskać przydatne dodatkowe informacje i sprawdzić procedurę. Specyficznych analiz chemicznych można również użyć do zmierzenia produktów przemiany powstałych podczas degradacji badanej substancji i jest to zalecane dla substancji, które są mineralizowane z czasem półtrwania przekraczającym 60 dni. Za każdym razem podczas próbkowania należy zmierzyć stężenie badanej substancji i produktów przemiany i podać je w sprawozdaniu (jako stężenie i jako procentowość zastosowanego stężenia). Na ogół powinno się identyfikować produkty przemiany wykryte w ilości $\geq 10\%$ zastosowanego stężenia podczas każdego próbkowania, o ile nie jest uzasadnione inaczej istotnymi względami. Produkty przemiany, dla których stężenia wzrastają w sposób ciągły podczas badania, należy również uwzględnić przy identyfikacji, nawet jeśli ich stężenia nie przekraczają podanej wyżej granicy, gdyż może to oznaczać utrzymywanie się tendencji. Analizy produktów przemiany w próbach sterylizowanych powinny być wzięte pod uwagę, jeżeli uważa się za możliwą szybką abiotyczną przemianę badanej substancji (np. hydrolizę). Potrzebę kwantyfikacji i identyfikacji produktów przemiany należy rozważyć dla każdego przypadku oddzielnie, z podaniem uzasadnień w sprawozdaniu. Techniki ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika organicznego należy zastosować zgodnie ze wskazówkami podanymi w odnośnej procedurze analitycznej.

Wszystkie próbki należy przechowywać w temperaturze $2-4\text{ }^\circ\text{C}$ i w warunkach hermetycznych, jeśli analizę przeprowadza się w ciągu 24 godzin (preferowane). Do dłuższego przechowywania, próbki należy zamrozić do temperatury poniżej $-18\text{ }^\circ\text{C}$ lub chemicznie zakonserwować. Zakwaszanie nie jest zalecanym sposobem konserwacji próbek, ponieważ zakwaszone próbki mogą być nietrwałe. Jeżeli próbki nie są zanalizowane w ciągu 24 i są poddane dłuższemu przechowywaniu, to należy przeprowadzić badanie trwałości podczas przechowywania w celu wykazania trwałości substancji chemicznych będących przedmiotem zainteresowania w temperaturze poniżej $-18\text{ }^\circ\text{C}$ lub w warunkach konserwacji. Jeżeli metoda analityczna wiąże się z ekstrakcją rozpuszczalnikową lub ekstrakcją fazy stałej (SPE), to ekstrakcję należy wykonać natychmiast po pobraniu próbki lub po przechowaniu schłodzonej próbki maksymalnie przez 24 godziny.

W zależności od czułości metody analitycznej, mogą być konieczne większe objętości próbek niż te, które podano w sekcji 1.8.1. Badanie można łatwo przeprowadzić z objętościami próbnymi wynoszącymi jeden litr w kolbach o pojemności 2–3 litrów, co pozwala na pobranie próbek o objętości ok. 100 ml.

2. DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA

2.1. OBRÓBKA WYNIKÓW

2.1.1. Wykreślne przedstawienie danych

Zaokrąglić czasy pobierania próbek do całkowitej liczby godzin (chyba że substancja ulega istotnej degradacji w czasie trwającym w minutach lub godzinach), lecz nie do całkowitej liczby dni. Wykreślić oszacowane wartości aktywności resztkowej badanej substancji (dla substancji znakowanych za pomocą ^{14}C) lub stężenie resztkowe (dla nieznakowanych substancji) w zależności od czasu na wykresie liniowym lub półlogarytmicznym (zob. rysunki 1a, 1b). Jeśli miała miejsce degradacja, to porównać wyniki z kolb F_T z wynikami z kolb F_S . Jeżeli średnie wyników uzyskanych z kolb z badaną substancją (F_T) i kolb sterylizowanych (F_S) różnią się o mniej niż 10%, to można założyć, że zaobserwowana degradacja jest w przeważającej mierze abiotyczna. Jeżeli degradacja w kolbach F_S jest mniejsza, to wielkości tych można użyć do skorygowania wielkości uzyskanych z kolb F_T (przez odjęcie), aby oszacować stopień biodegradacji. Gdy wykonywane są dodatkowe analizy dla głównych produktów przemiany, to należy również przedstawić wykres ich powstawania i spadku zawartości, oprócz wykresu spadku zawartości badanej substancji.

Oszacować czas trwania fazy zastoju t_i na podstawie krzywej degradacji (wykresu półlogarytmicznego) przez ekstrapolację jej liniowej części do zerowej degradacji lub, alternatywnie, przez wyznaczenie czasu dla przybliżonej 10 % degradacji (zob. rysunki 1a i 1b). Na podstawie wykresu półlogarytmicznego oszacować stałą szybkości pierwszego rzędu, k , oraz jej błąd standardowy za pomocą regresji liniowej \ln (aktywności resztkowej ^{14}C lub stężenia badanej substancji) w zależności od czasu. W szczególności w przypadku pomiarów ^{14}C użyć tylko danych należących do początkowej liniowej części krzywej po zakończonej fazie zastoju i wybrać raczej niewielką liczbę reprezentatywnych danych niż większą liczbę bardziej niepewnych danych. Niepewność obejmuje tu błędy związane z zaleconym bezpośrednim użyciem zmierzonych aktywności resztkowej ^{14}C (zob. poniżej). Niekiedy może być właściwe obliczenie dwu różnych stałych szybkości, jeżeli degradacja przebiega dwufazowo. W tym celu określono dwie różne fazy krzywej degradacji. Obliczenia stałej szybkości, k , oraz czasu półtrwania $t_{1/2} = \ln 2/k$ należy przeprowadzić dla każdej spośród indywidualnych replikatowych kolb, gdy podpróbki są pobrane z tej samej kolby, lub używając średnich wartości, gdy podczas każdego próbkowania zbierane są pełne kolby (zob. ostatni akapit w sekcji 1.8.9.2). Gdy użyta jest pierwsza z wymienionych procedur, to stałą szybkości i czas półtrwania należy podać w sprawozdaniu dla każdej z indywidualnych replikatowych kolb oraz jako wartość średnią z błędem standardowym. Jeśli użyto wysokich stężeń badanej substancji, to krzywa degradacji może znacznie odbiegać od linii prostej (wykresu półlogarytmicznego) i kinetyka pierwszego rzędu może nie być ważna. Określenie półokresu nie posiada więc znaczenia. Jednakże dla ograniczonego zakresu danych można zastosować kinetykę pseudo pierwszego rzędu i oszacować półokres degradacji DT_{50} (czas do osiągnięcia 50 % degradacji). Należy pamiętać jednak, że przebiegu czasowego degradacji poza wybranym zakresem danych nie da się przewidzieć przy użyciu DT_{50} , który jest jedynie deskryptorem danego zbioru danych. Analityczne narzędzia służące do ułatwienia obliczeń statystycznych i dopasowywania krzywych są łatwo dostępne i zaleca się użycie tego rodzaju oprogramowania.

Jeżeli wykonywane są specyficzne analizy chemiczne, należy oszacować stałe szybkości i czas półtrwania dla pierwotnej degradacji, jak powyżej dla całkowitej mineralizacji. Jeżeli pierwotna degradacja jest procesem ograniczającym, to można niekiedy użyć punktów danych z całego przebiegu degradacji. Wynika to stąd, iż pomiary te są bezpośrednie, w przeciwieństwie do pomiarów aktywności ^{14}C .

Jeżeli są używane substancje znakowane za pomocą ^{14}C , to bilans masy należy wyrazić w procentach zastosowanego stężenia, przynajmniej na końcu badania.

2.1.2. Aktywność resztkowa

Gdy znakowana za pomocą ^{14}C część substancji organicznej ulega biodegradacji, to znaczna część ^{14}C zamienia się w $^{14}\text{CO}_2$, podczas gdy reszta zostaje zużyta do wzrostu biomasy i/lub syntezy pozakomórkowych metabolitów. Dlatego pełna „ostateczna” biodegradacja substancji nie powoduje 100 % zamiany jej węgla w $^{14}\text{CO}_2$. ^{14}C wbudowany w produkty utworzone w wyniku biosyntezy jest następnie powoli uwalniany jako $^{14}\text{CO}_2$ na skutek „wtórnej mineralizacji”. Z tych powodów wykresy zależności aktywności resztkowej organicznego ^{14}C (zmierzonej po usunięciu CO_2) lub wytworzonego $^{14}\text{CO}_2$ od czasu wykazywać będą tworzenie się „ogona” po zakończeniu degradacji. Komplikuje to kinetyczną interpretację danych i w tym celu do oszacowania stałej szybkości degradacji zwykle należy wykorzystać tylko początkową część krzywej (po zakończeniu się fazy zastoju a przed osiągnięciem ok. 50 % degradacji). Jeżeli badana substancja ulega degradacji, to całkowita aktywność resztkowego organicznego ^{14}C jest zawsze wyższa od aktywności ^{14}C związanego z pozostałą nienaruszoną badaną substancją. Jeżeli badana substancja ulega degradacji wskutek reakcji pierwszego rzędu i stały ułamek α zostaje zmineralizowany do CO_2 , to początkowe nachylenie krzywej zaniku ^{14}C (całkowity organiczny ^{14}C w zależności od czasu) będzie równe α razy nachylenie odpowiedniej krzywej dla stężenia badanej substancji (lub, ściślej biorąc, części badanej substancji oznakowanej za pomocą ^{14}C). Gdy używa się pomiarów aktywności całkowitego organicznego ^{14}C bez korekty, to obliczona stała szybkości degradacji będzie stanowić ostrożne oszacowanie. Procedury szacowania stężeń badanych substancji na podstawie aktywności radiochemicznych, oparte o różne upraszczające założenia, zostały opisane w literaturze (2)(9)(10)(11). Procedury takie najłatwiej jest stosować do substancji szybko ulegających degradacji.

2.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Jeżeli stwierdza się, że k jest niezależna od dodanego stężenia (tj. jeżeli obliczona k jest w przybliżeniu taka sama przy różnych stężeniach badanej substancji), to można założyć, że stała szybkości pierwszego rzędu jest reprezentatywna dla zastosowanych warunków badania, tj. badanej substancji, próbki wody i temperatury badania. To, w jakim stopniu wyniki można uogólnić lub ekstrapolować do innych układów, musi zostać określone na podstawie specjalistycznej opinii. Jeżeli użyte jest wysokie stężenie badanej substancji i w związku z tym degradacja nie przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, to danych nie można wykorzystać do bezpośredniego oszacowania stałej szybkości pierwszego rzędu lub odpowiadającego jej czasu półtrwania. Jednakże dane pochodzące z badania, w którym użyto wysokiego stężenia badanej substancji, mogą nadal być przydatne do oszacowania stopnia całkowitej mineralizacji i/lub wykrycia i kwantyfikacji produktów przemiany.

Jeżeli znane są szybkości procesów powodujących stratę, innych niż biodegradacja (np. hydrolizy lub ulatniania się), to można odjąć je od szybkości straty netto zaobserwowanej podczas badania, uzyskując przybliżone oszacowanie szybkości biodegradacji. Dane dla hydrolizy, na przykład, można uzyskać ze sterylnej próby kontrolnej lub z równoległego badania z użyciem wyższego stężenia badanej substancji.

Pośrednie i bezpośrednie oznaczanie $^{14}\text{CO}_2$ (sekcja 1.8.9.4 i dodatek 3) można zastosować jedynie do pomiaru stopnia mineralizacji badanej substancji do CO_2 . Do analizy stężeń badanej substancji znakowanej za pomocą ^{14}C oraz powstawania głównych produktów przemiany można zastosować radiochromatografię (RAD-TLC) lub HPLC (akapit trzeci w sekcji 1.8.9.4). Aby umożliwić bezpośrednie oszacowanie czasu półtrwania główne produkty przemiany (określone jako $\geq 10\%$ zastosowanej ilości badanej substancji) muszą być nieobecne. Jeżeli występują główne produkty przemiany, zgodnie z powyższym określeniem, wymagana jest szczegółowa ocena danych. Może ona obejmować wielokrotne badania i/lub identyfikację produktów przemiany (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.5), chyba że los produktów przemiany można w sposób rozsądny ocenić na podstawie doświadczenia (np. informacji o drodze degradacji). Ponieważ część badanej substancji ulegająca przemianie w CO_2 jest zmienna (zależąc w dużej mierze od stężenia badanej substancji oraz innych dostępnych substratów, warunków badania oraz zespołu drobnoustrojów), badanie to nie pozwala na proste oszacowanie ostatecznej biodegradacji, jak w próbie zanikania RWO; lecz wynik jest podobny do uzyskanego przy pomocy badania respirometrycznym. Stopień mineralizacji będzie więc mniejszy lub równy minimalnemu poziomowi ostatecznej biodegradacji. Aby uzyskać pełniejszy obraz ostatecznej biodegradacji (mineralizacji i włączenia do biomasy), na końcu badania należy przeprowadzić analizę rozkładu fazowego ^{14}C (zob. dodatek 1). ^{14}C w określonej puli składać się będzie z ^{14}C włączanego do bakteryjnej biomasy oraz ^{14}C zesorbowanego do cząstek organicznych.

2.3. WAŻNOŚĆ BADANIA

Jeżeli substancja odniesienia nie ulega degradacji w spodziewanym przedziale czasu (dla aniliny i benzoenu sodu zwykle krótszym niż dwa tygodnie), to ważność badania jest niepewna i musi zostać poddana dalszej weryfikacji lub, alternatywnie, badanie należy powtórzyć z nową próbką wody. W zgodnym z ISO pierścieniowym teście metody, w którym uczestniczyło siedem laboratoriów z całej Europy, dostosowane stałe szybkości degradacji dla aniliny wynosiły w granicach od 0,3 do 1,7 dzień⁻¹ ze średnią 0,8 d⁻¹ w 20 °C i z błędem standardowym $\pm 0,4$ d⁻¹ ($t_{1/2} = 0,9$ dnia). Typowe czasy zastoju wynosiły 1–7 dni. Podano, że badane wody miały bakteryjną biomasę odpowiadającą 10^3 – 10^4 jednostek tworzących kolonię (CFU) na ml. Szybkości degradacji w bogatych w składniki odżywcze wodach środkowoeuropejskich były większe niż w skandynawskich wodach oligotroficznymi, co może być spowodowane innym troficznym statusem lub uprzednią ekspozycją na substancje chemiczne.

Całkowity odzysk (bilans masy) na końcu doświadczenia powinien zawierać się w granicach 90–110 % dla substancji znakowanych izotopem promieniotwórczym, podczas gdy dla substancji nieznakowanych początkowy odzysk na początku doświadczenia powinien wynosić 70–110 %. Jednakże podane zakresy należy interpretować jedynie jako cele i nie należy używać ich jako kryteriów dla przyjęcia badania.

3. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

W sprawozdaniu z badania należy wyraźnie podać typ badania, tj. czy jest to próba pelagiczna czy próba zawieszono-osadu, przy czym powinno ono również zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja i substancja(-e) odniesienia:

- nazwy pospolite, nazwy chemiczne (zalecane nazwy IUPAC i/lub CAS), numery CAS, wzory strukturalne (wskazujące położenie ^{14}C , jeśli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym) oraz stosowne własności fizykochemiczne badanej substancji i substancji odniesienia (zob. sekcje 1.5 i 1.6),
- nazwy chemiczne, numery CAS, wzory strukturalne (wskazujące położenie ^{14}C , jeśli użyta jest substancja znakowana izotopem promieniotwórczym) oraz stosowne własności fizykochemiczne substancji użytych jako wzorce do identyfikacji i kwantyfikacji produktów przemiany,
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji i substancji odniesienia,
- radiochemiczna czystość znakowanej substancji chemicznej oraz aktywność właściwa (tam gdzie stosowne).

Woda powierzchniowa:

Należy podać, jako minimum, następujące informacje dotyczące próbki wody:

- lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia,
- data i godzina pobrania próbki,
- składniki odżywcze (całkowity N, amon, azotyn, azotan, całkowity P, rozpuszczony ortofosforan),
- głębokość pobrania,
- wygląd próbki (np. barwa i mętność),
- RWO i TOC,
- BOD,
- temperatura i pH w miejscu oraz czas pobrania,
- potencjał tlenowy i redoks (obowiązkowy tylko wówczas, jeśli warunki aerobowe nie są oczywiste),
- zasolenie lub konduktywność (w przypadku wody morskiej lub słonawej),
- zawieszone cząstki stałe (w przypadku mętnej próbki),
- ewentualnie inne istotne informacje o miejscu próbkowania w czasie pobierania próbki (np. faktyczne lub historyczne dane dotyczące natężenia przepływu rzek lub prądów morskich, pobliskie ważniejsze odprowadzenia ścieków i ich typ, warunki atmosferyczne poprzedzające czas pobrania próbki),

oraz nieobowiązkowo:

- biomasę drobnoustrojów (np. bezpośrednią liczbę uzyskaną za pomocą oranżu akrydynowego lub jednostki tworzące kolonię),
- węgiel nieorganiczny,
- stężenie chlorofilu a jako swoiste oszacowanie biomasy alg.

Ponadto należy podać następujące informacje o osadzie, jeśli przeprowadzona jest próba zawieszonego osadu:

- głębokość pobrania osadu,
- wygląd osadu (np. zabarwiony, szlamowaty, mulisty lub piaszczysty),
- struktura (np. % grubego piasku, drobnego piasku, mułu i gliny),
- ciężar suchej masy w g/l zawieszonych cząstek, stężenie TOC lub utrata ciężaru po zapłonie, jako miara zawartości materii organicznej,
- pH,
- potencjał tlenowy i redoks (obowiązkowy tylko wówczas, jeśli warunki aerobowe nie są oczywiste).

Warunki badania:

- upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu laboratoryjnym, przechowywanie próbki i wstępna obróbka próbki, daty przeprowadzenia badań,
- ilość zastosowanej substancji badanej, stężenie próbne oraz substancja odniesienia,
- metoda wprowadzenia badanej substancji, w tym ewentualne użycie rozpuszczalników,

- objętość użytej wody powierzchniowej i osadu (jeśli jest użyty) oraz objętość pobrana każdorazowo do analizy,
- opis zastosowanego układu badawczego.

Jeśli nie mają być utrzymane warunki ciemności — informacje o warunkach „rozproszonego światła”,

- informacje o metodzie(-ach) zastosowanej do przygotowania sterylizowanych prób kontrolnych (np. temperatura, czas i ilość obróbek w autoklawie),
- temperatura inkubacji,
- informacje o analitycznych technikach i metodzie(-ach) zastosowanej/ych do pomiarów radiochemicznych oraz do sprawdzania bilansu masy i pomiarów rozkładu fazowego (jeśli jest przeprowadzony),
- liczba replikatów.

Wyniki:

- procenty odzysku (zob. sekcja 1.7.1),
- powtarzalność i czułość zastosowanych metod analitycznych, w tym granica wykrywalności (LOD) oraz granica kwantyfikacji (LOQ) (zob. sekcja 1.7.2),
- wszystkie zmierzone dane (w tym punkty czasowe próbkowania) oraz obliczone wartości w postaci tabelarycznej i krzywych degradacji; dla każdego stężenia próbnego i dla każdej replikatowej kolby należy podać współczynnik korelacji liniowej dla nachylenia wykresu logarytmicznego, oszacowaną fazę zastoju oraz stałą szybkości pierwszego rzędu lub pseudo pierwszego rzędu (jeśli to możliwe) oraz odpowiadający jej czas półtrwania degradacji (lub okres półtrwania, t_{50}),
- podać stosowne wartości jako średnie z wyników zaobserwowanych w indywidualnych replikatach, np. długość fazy zastoju, stałą szybkości degradacji i czas półtrwania degradacji (lub t_{50}),
- określić kategorię układu, jako niezaadaptowany lub zaadaptowany, na podstawie wyglądu krzywej degradacji oraz na podstawie ewentualnego wpływu stężenia próbnego,
- wyniki końcowego sprawdzenia bilansu masy oraz wyniki pomiarów rozkładu fazowego (jeśli są wykonane),
- frakcja zmineralizowanego ^{14}C oraz, jeżeli zastosowane są specyficzne analizy, końcowy poziom pierwotnej degradacji,
- identyfikacja, molowe stężenie i procentowość zastosowanej badanej substancji oraz głównych produktów przemiany (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.8.9.5), tam gdzie stosowne,
- proponowana droga przemiany, tam gdzie stosowne,
- omówienie wyników.

4. LITERATURA

- (1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.
- (2) ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
- (3) Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.
- (4) Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.
- (5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.
- (6) ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

- (7) ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (8) OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).
 - (9) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 394–401.
 - (10) Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274–283.
 - (11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
-

Dodatek 1

Rozkład fazowy ^{14}C

Aby sprawdzić procedurę, rutynowe pomiary aktywności pozostałego całkowitego organicznego ^{14}C (TOA) należy uzupełnić pomiarami bilansu masy polegającymi na bezpośrednim wyznaczeniu wydzielonego $^{14}\text{CO}_2$ po wychwyceniu go w absorberze (zob. dodatek 3). Dodatkowo wytworzenie się $^{14}\text{CO}_2$ samo w sobie jest bezpośrednim dowodem biodegradacji, w odróżnieniu od degradacji abiotycznej lub innych mechanizmów straty, takich jak ulatnianie się lub sorpcja. Dodatkowe użyteczne informacje charakteryzujące przebieg biodegradacji można uzyskać z pomiarów rozkładu TOA pomiędzy stan rozpuszczony (aktywność rozpuszczonego organicznego ^{14}C , DOA) a stan cząstkowy (aktywność cząstkowego organicznego ^{14}C , POA) po separacji cząstek stałych poprzez filtrację przeponową lub odwirowanie. Na POA składa się badana substancja zesorbowana na biomase drobnoustrojów oraz na innych cząstkach, oraz węgiel badanej substancji, który został zużyty na syntezę nowego materiału komórkowego, a przez to włączony do frakcji biomasy cząstkowej. Utworzenie się rozpuszczonego materiału organicznego ^{14}C można oszacować jako DOA na końcu biodegradacji (plateau na krzywej zależności degradacji od czasu).

Oszacować rozkład fazowy resztkowego ^{14}C w wybranych próbkach przez przefiltrowanie próbek na filtrze przeponowym 0,22 μm lub 0,45 μm wykonanym z materiału, który nie adsorbuje znaczących ilości badanej substancji (odpowiednie mogą być filtry poliwęglanowe). Jeżeli sorpcja badanej substancji na filtrze jest zbyt duża, aby można było ją pominąć (należy to sprawdzić przed doświadczeniem), to zamiast filtracji można zastosować odwirowanie z wysoką prędkością (2 000 g; 10 min).

Postąpić z filtratem lub odwirowanym materiałem tak, jak opisano w dodatek 3 dla niefiltrowanych próbek. Rozpuścić filtry przeponowe w odpowiednim płynie scyntylicyjnym i wykonać zliczenie, jak zwykle, normalnie stosując tylko metodę stosunku zewnętrznego wzorca, aby dokonać poprawki wygaszania, bądź użyć utleniacza próbki. Jeżeli zastosowane zostało odwirowanie, to z grudki utworzonej z frakcji cząstkowej ponownie utworzyć zawiesinę w 1–2 ml wody destylowanej i przenieść do fiolki scyntylicyjnej. Następnie przemyć dwukrotnie 1 ml wody destylowanej i przenieść wodę płuczącą do fiolki. Jeśli to konieczne, zawiesinę można osadzić w żelu w celu wykonania cieczowego zliczenia scyntylicyjnego.

Dodatek 2

Procedura półciąгла

Może być konieczna przedłużona inkubacja trwająca do kilku miesięcy po to, aby osiągnąć degradację opornych substancji. Czas trwania badania normalnie nie powinien przekraczać 60 dni, chyba że cechy pierwotnej próbki wody są utrzymywane przez wymianę zawiesiny próbnej. Jednakże okres badania może być wydłużony do maksimum 90 dni bez wymiany zawiesiny próbnej, jeżeli degradacja badanej substancji rozpoczęła się w ciągu pierwszych 60 dni.

Podczas inkubacji przez długie okresy, różnorodność zespołu drobnoustrojów może ulec zmniejszeniu na skutek różnych mechanizmów straty oraz wskutek możliwego zmniejszania się w próbce wody ilości istotnych składników odżywczych i podstawowych substratów węglowych. Dlatego zaleca się, aby zastosować badanie półciągle w celu zadowalającego wyznaczenia szybkości degradacji substancji wolno ulegających degradacji. Badanie należy rozpocząć przez zastosowanie procedury półciąglej, jeżeli — na podstawie wcześniejszego doświadczenia — spodziewane jest, że do osiągnięcia 20 % degradacji badanej substancji niezbędny jest okres inkubacji wynoszący trzy miesiące. Alternatywnie, normalne badanie prowadzone w systemie okresowym można zamienić na badanie półciągle, jeżeli w ciągu około 60 dni badania z użyciem procedury okresowej nie osiągnięto degradacji badanej substancji. Procedurę półciąglą można zatrzymać i kontynuować badanie jako doświadczenie okresowe, gdy odnotuje się istotną degradację (np. > 20 %).

W badaniu półciąglym, co dwa tygodnie wymienia się około jedną trzecią objętości zawiesiny próbnej na świeżo pobraną wodę z badaną substancją, dodaną do początkowego stężenia. Podobnie, do wymiennej wody dodaje się osad do początkowego stężenia (0,01–1 g/l), jeżeli przeprowadza się dodatkowo próbę zawieszoności osadu. Przeprowadzając badanie z zawieszonymi cząstkami stałymi osadu, ważne jest, aby również podczas wymiany wody utrzymywać układ w stanie pełnego zawieszenia i aby czas przebywania był identyczny dla cząstek stałych i wody, gdyż w przeciwnym razie utracone zostanie zamierzone podobieństwo do jednorodnego układu wodnego bez ustalonych faz. Z tych względów, gdy stosowana jest procedura półciąglą, preferowane jest początkowe stężenie zawieszonych osadów w dolnym przedziale wyznaczonego zakresu.

Zalecone dodanie badanej substancji oznacza, że początkowe stężenie badanej substancji nie zostaje przekroczone wskutek częściowej wymiany zawiesiny próbnej, a przez to unika się adaptacji, którą często obserwuje się przy wysokich stężeniach badanej substancji. Ponieważ procedura obejmuje zarówno ponowną inokulację, jak i kompensację wyczerpanych składników odżywczych i głównych substratów, zostaje przywrócona początkowa różnorodność zespołu drobnoustrojów, a czas trwania badania można w zasadzie wydłużyć do nieskończoności. Gdy stosuje się procedurę półciąglą, należy pamiętać, że resztkowe stężenie badanej substancji musi być skorygowane pod względem dodanych lub usuniętych ilości badanej substancji podczas każdej procedury wymiany. Stężenie całkowitej i rozpuszczonej badanej substancji może być używane zamiennie w przypadku związków mało sorbujących. Sorpcja jest nieznaczająca (< 5 %) w określonych warunkach (0,1–1 g cząstek stałych/l) dla substancji o $\log K_{ow} < 3$ (ważne dla związków obojętnych, lipofilowych). Ilustruje to następujący przykład obliczeniowy. 0,1 g/l cząstek stałych w przybliżeniu odpowiada 10 mg węgla na litr (ułamek węgla, $f_c = 0,01$). Zakładając, że:

$$\log K_{ow} (\text{badanej substancji}) = 3$$

$$K_{oc} = 0,42 \times K_{ow}$$

$$\text{Współczynnik podziału, } K_d = f_c \times K_{oc}$$

zatem, rozpuszczony ułamek całkowitego stężenia (C-woda (C_w)/C-całkowity (C_t)) wynosi:

$$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{oc} \times f_c \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$$

Dodatek 3

Oznaczanie $^{14}\text{CO}_2$ Pośrednie oznaczenie $^{14}\text{CO}_2$

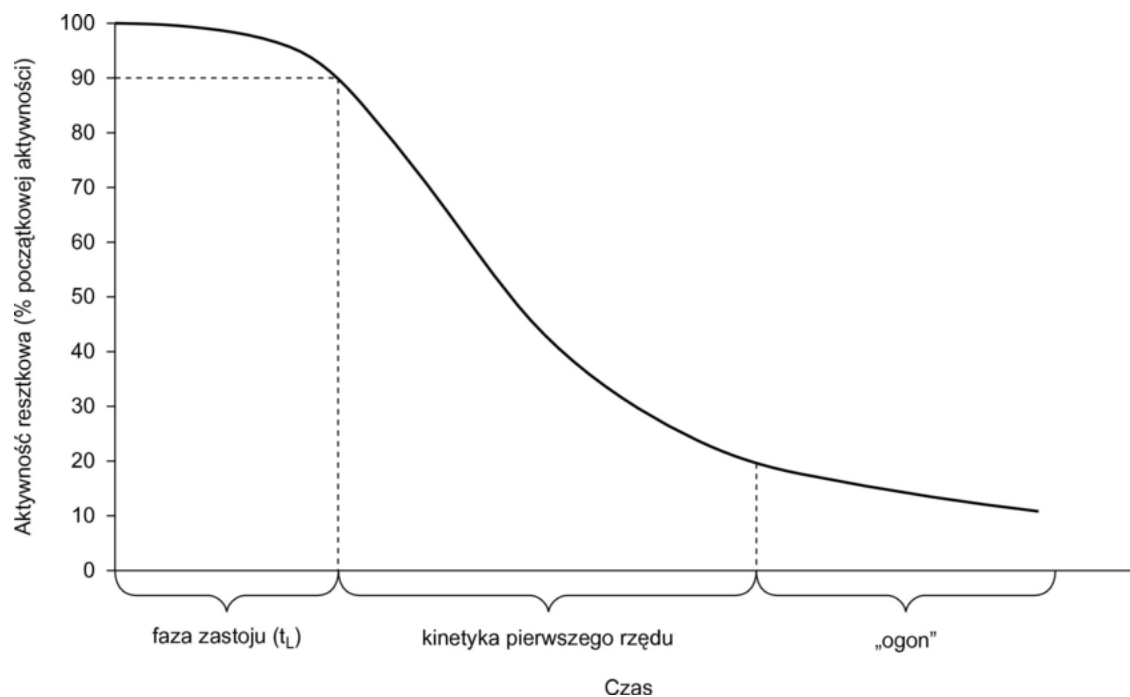
Dla rutynowych pomiarów metoda pośrednia jest zwykle najmniej czasochłonną i najbardziej dokładną metodą, jeżeli badana substancja jest nielotna i nie zamienia się w lotne produkty przemiany. Należy jedynie przenieść niefiltrowane próbki, o objętości np. 5 ml, do fiolek scyntylacyjnych. Odpowiednia aktywność w próbkach wynosi początkowo 5 000–10 000 dpm (80–170 Bq), a minimalna początkowa aktywność wynosi około 1 000 dpm. CO_2 należy usunąć po zakwaszeniu do pH 2–3 przy pomocy 1–2 kropli stężonego H_3PO_4 lub HCl . Usunięcia CO_2 można dokonać poprzez barbotowanie powietrzem przez około ½–1 godziny. Alternatywnie fiołki można energicznie wstrząsać przez 1–2 godziny (na przykład na wstrząsarce mikropłytowej) lub, stosując łagodniejsze wstrząsanie, pozostawić na noc. Należy sprawdzić efektywność procedury usuwania CO_2 (przez przedłużenie okresu napowietrzania lub wstrząsania). Następnie należy dodać ciecz scyntylacyjną odpowiednią do zliczania próbek wodnych, ujednorodnić próbkę na mieszadle wirowym i wyznaczyć radioaktywność za pomocą cieczowego zliczania scyntylacyjnego, odejmując aktywność tła stwierdzoną w ślepych próbach (F_B). O ile badana woda nie jest silnie zabarwiona lub nie zawiera wysokiego stężenia cząstek stałych, próbki zwykle będą wykazywać równomierne wygaszanie i wystarczające będzie wykonanie poprawek wygaszania przy użyciu zewnętrznego wzorca. Jeżeli badana woda jest silnie zabarwiona, to konieczna może być poprawka wygaszania poprzez dodanie wewnętrznego wzorca. Jeśli stężenie cząstek stałych jest wysokie, to może nie być możliwe uzyskanie jednorodnego roztworu lub żelu bądź też może występować duża zmienność wygaszania pomiędzy próbkami. W takim przypadku można użyć metody zliczania opisanej poniżej dla szlamów próbnych. Jeżeli badanie przeprowadza się jako próbę zawieszono osadu, to pomiar $^{14}\text{CO}_2$ można wykonać pośrednio, pobierając jednorodną próbkę 10 ml badanej wody/zawiesiny i rozdzielając fazy przez odwirowanie z odpowiednią prędkością (np. 40 000 m/s^2 przez 15 min). Fazę wodną należy następnie potraktować, jak opisano powyżej. Aktywność ^{14}C w fazie cząstkowej (POA) należy wyznaczyć przez ponowne sporządzenie zawiesiny osadu w niewielkiej objętości wody destylowanej, przeniesienie jej do fiolek scyntylacyjnych i dodanie cieczy scyntylacyjnej w celu utworzenia żelu (do tego celu dostępne są specjalne ciecze scyntylacyjne). W zależności od charakteru cząstek (np. zawartości w nich materiału organicznego), może być możliwe roztworzenie próbki przez noc za pomocą solubilizatora tkankowego, a następnie ujednorodnienie na mieszadle wirowym przed dodaniem cieczy scyntylacyjnej. Alternatywnie POA można wyznaczyć przez spalenie w nadmiarze tlenu, używając utleniacza próbek. Podczas zliczania należy zawsze włączyć wewnętrzne wzorce, a także może być niezbędne dokonanie korekt wygaszania przy użyciu dodatku wewnętrznego wzorca dla każdej indywidualnej próbki.

Bezpośrednie oznaczenie $^{14}\text{CO}_2$

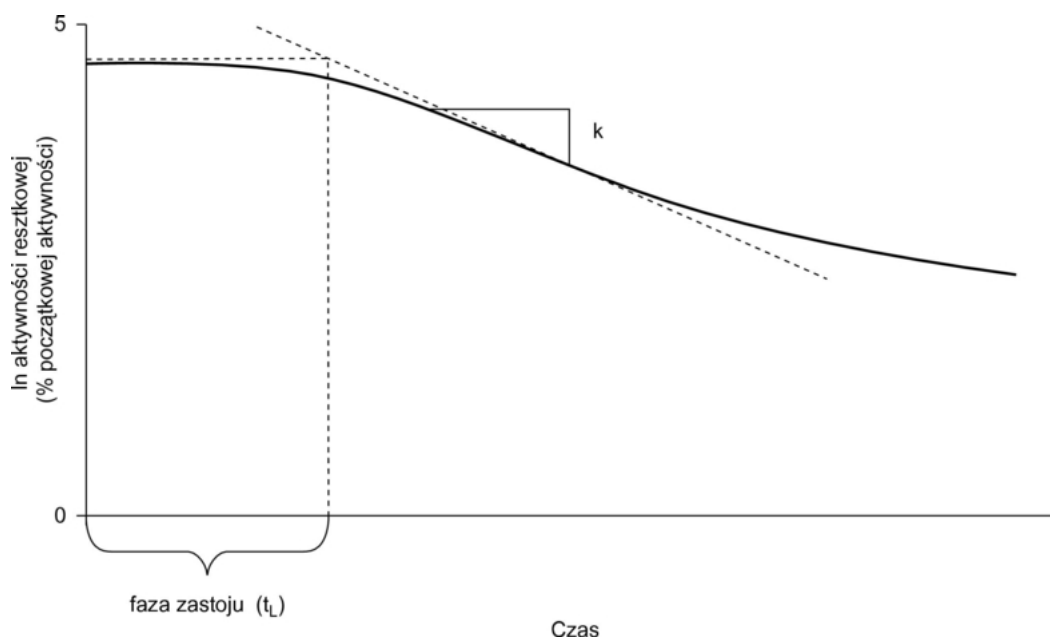
Jeżeli wydzielony $^{14}\text{CO}_2$ mierzy się bezpośrednio, to należy to wykonać, przygotowując na początku badania większą ilość kolb, zbierając kolby próbne w każdym punkcie pomiaru przez zakwaszenie kolb próbnych do pH 2–3 i wychwycenie $^{14}\text{CO}_2$ w wewnętrznym (umieszczonym w każdej kolbie próbnej na początku badania) lub zewnętrznym absorberze. Jako czynnika absorbującego można użyć absorbera alkalicznego (np. 1 N roztwór NaOH lub tabletki NaOH), atanolaminy lub absorbera na jej bazie lub absorbery dostępne w handlu. Do bezpośrednich pomiarów $^{14}\text{CO}_2$, kolby powinny być zamknięte np. za pomocą przykrywkę z gumy butylowej.

Rysunek 1a

Przykład arytmetycznego wykresu danych (aktywność resztkowa w zależności od czasu)



Rysunek 1b

Przykład półlogarymicznego wykresu plot danych (\ln z aktywności resztkowej w zależności od czasu)

ZAŁĄCZNIK VI

C.26. BADANIE INHIBICJI WZROSTU GATUNKU LEMNA

1. METODA

Niniejsza metoda odpowiada TG 221 OECD (2006) (1). Wśród organów UE panuje powszechna zgoda co do tego, że badanie *Lemna* jest odpowiednią alternatywą dla badania na glonach w przypadku mocno zabarwionych substancji (2) (3).

1.1. WSTĘP

Niniejsza metoda badawcza służy do oceny toksyczności substancji w stosunku do roślin słodkowodnych gatunku *Lemna* (rzęsy wodnej). Jest ona oparta o istniejące wytyczne (4)(5)(6)(7)(8)(9), lecz zawiera modyfikacje tychże metod, uwzględniające najnowsze badania i konsultacje w sprawie szeregu podstawowych kwestii. Proponowana metoda została potwierdzona za pomocą międzynarodowej próby pierścieniowej (10).

Niniejsza metoda badawcza opisuje gatunki *Lemna gibba* i *Lemna minor*, z których obydwa zostały szeroko zbadane i są przedmiotem przywołanych wyżej norm. Taksonomia gatunków *Lemna* jest trudna, gdyż komplikuje ją istnienie wielu różnych fenotypów. Choć w przypadku *Lemna* może występować genetyczna zmienność pod względem reakcji na czynniki toksyczne, to obecnie istnieje niewystarczająca ilość danych na temat tego źródła zmienności, tak aby zalecić określony klon do użycia z niniejszą metodą badawczą. Należy zwrócić uwagę, że badanie nie jest przeprowadzane aksenicznie, lecz na poszczególnych etapach w trakcie procedury badawczej podejmowane są kroki, aby ograniczyć zanieczyszczenie innymi organizmami do minimum.

Opisano szczegóły badania z odnawianiem (badanie półstatyczne i przepływowo) i bez odnawiania (badanie statyczne) roztworu testowego. W zależności od celów badania oraz od wymagań regulacyjnych zaleca się, aby rozważyć zastosowanie metody półstatycznej i przepływowej, np. dla substancji, które są szybko tracone z roztworu na skutek ulatniania się, fotodegradacji, wytrącania się lub biodegradacji. Dalsze wskazówki podano w (11).

1.2. DEFINICJE

Do celów niniejszej metody badawczej użyto następujących definicji i skrótów:

Biomasa: jest to ciężar suchej masy substancji żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu zwykle mierzy się surogaty biomasy, takie jak liczba lub powierzchnia liści, a przez to użycie określenia „biomasa” odnosi się również do tych surogatowych miar.

Chloroza: jest to żółknięcie tkanki liści.

Klon: jest to organizm lub komórka powstała z pojedynczego osobnika przez rozmnażanie bezpłciowe. Osobniki z tego samego klonu są zatem genetycznie identyczne.

Kolonia: oznacza skupisko macierzystych lub pochodnych liści (zwykle 2 do 4) przyczepionych do siebie nawzajem. Niekiedy określana jest mianem rośliny.

EC_x: jest to stężenie substancji testowej rozpuszczonej w pożywce, które powoduje redukcję wzrostu *Lemna* o x % (np. 50 %) w danym okresie ekspozycji (który należy wyraźnie podać, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu lub uzysku, do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_rC” a do uzysku symbolu „E_yC”, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E_rC (liczba liści).

Badanie przepływowe: jest to badanie, w którym roztwory testowe są wymieniane w sposób ciągły.

Liść: jest to indywidualna/pojedyncza „liściopodobna” struktura rośliny rzęsy wodnej. Jest to najmniejsza jednostka, tj. osobnik, zdolna do rozmnażania się.

Garbatość: oznacza liście o zgarbionym lub spuchniętym wyglądzie.

Wzrost: jest to przyrost zmiennej pomiarowej, jak np. liczba liści, ciężar masy suchej, ciężar masy wilgotnej lub powierzchnia liści, w ciągu okresu badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu): jest to logarytmiczny przyrost biomasy w ciągu okresu ekspozycji.

Najmniejszy obserwowany poziom stężenia (LOEC): jest to najniższe stężenie testowe, przy którym obserwuje się, że substancja ma statystycznie istotny redukujący wpływ na wzrost (przy $p < 0,05$) w porównaniu do próby kontrolnej, w danym czasie ekspozycji. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy skutek równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. Gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, to należy podać pełne wyjaśnienie, w jaki sposób LOEC (a stąd NOEC) zostało wybrane.

Zmienne pomiarowe: są to dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy badania przy użyciu jednej lub więcej różnych zmiennych odpowiedzi. W niniejszej metodzie zmiennymi pomiarowymi są: liczba liści, powierzchnia liści, ciężar masy świeżej i ciężar masy suchej.

Monokultura: jest to kultura z jednym gatunkiem rośliny.

Martwica: jest to umarła (tj. biała lub nasiąknięta wodą) tkanka listna.

Nieobserwowany wpływ stężenia (NOEC): jest to stężenie testowe bezpośrednio poniżej LOEC.

Fenotyp: są to obserwowalne cechy organizmu zdeterminowane przez współdziałanie jego genów z jego środowiskiem.

Zmienne odpowiedzi: są to zmienne służące do oszacowywania toksyczności, uzyskane na podstawie zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody zmiennymi odpowiedzi są: szybkości wzrostu i uzysk, które otrzymuje się ze zmiennych pomiarowych, takich jak liczba liści, powierzchnia liści, ciężar masy świeżej lub ciężar masy suchej.

Badanie półstatyczne (z odnawianiem): jest to badanie, w którym roztwór testowy jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne: jest to metoda badania bez odnawiania roztworu testowego w trakcie badania.

Punkt końcowy badania: opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem testowej substancji chemicznej w stosunku do próby kontrolnej, jako cel badania. W niniejszej metodzie punktem końcowym badania jest inhibicja wzrostu, którą można wyrazić za pomocą różnych zmiennych odpowiedzi opartych o jedną lub więcej zmiennych pomiarowych.

Pożywka: jest to kompletne syntetyczne podłoże hodowlane, na którym rośliny wznoszą, gdy są wyeksponowane na działanie substancji testowej. Substancja testowa zwykle jest rozpuszczona w pożywce.

Uzysk: jest to wartość zmiennej pomiarowej wyrażająca biomasę na końcu okresu ekspozycji minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu ekspozycji.

1.3. ZASADA BADANIA

Wzrastającym wykładniczo kulturom roślinnym rodzaju *Lemna* umożliwia się wzrastać w postaci monokultur przy różnych stężeniach substancji testowej w ciągu okresu siedmiu dni. Celem badania jest ilościowe określenie związanych z substancją oddziaływań na wegetatywny wzrost w ciągu tego okresu, na podstawie ocen wybranych zmiennych pomiarowych. Główną zmienną pomiarową jest liczba liści. Mierzy się również co najmniej jedną inną zmienną pomiarową (całkowitą powierzchnię liści, ciężar masy suchej lub świeżej), gdyż niektóre substancje mogą wpływać o wiele bardziej na inne zmienne pomiarowe niż ilość liści. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją, wzrost w roztworach testowych porównuje się do wzrostu w próbach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące inhibicję wzrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako EC_x (np. EC_{50}).

Punktem końcowym badania jest inhibicja wzrostu wyrażona jako logarytmiczny przyrost zmiennej pomiarowej (średnia właściwa szybkość wzrostu) w ciągu okresu ekspozycji. Na podstawie średnich właściwych szybkości wzrostu zarejestrowanych w serii roztworów testowych wyznacza się stężenie powodujące inhibicję szybkości wzrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako $E_r C_x$ (np. $E_r C_{50}$).

Dodatkową zmienną odpowiedzi użytą w niniejszej metodzie badawczej jest uzysk, który może być potrzebny do spełnienia określonych wymagań regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on zdefiniowany jako zmienne pomiarowe na końcu okresu ekspozycji minus zmienne pomiarowe na początku okresu ekspozycji. Na podstawie uzysku zarejestrowanego w serii roztworów testowych oblicza się stężenie powodujące inhibicję uzysku o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako $E_y C_x$ (np. $E_y C_{50}$).

Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie zaobserwowanego skutku (LOEC) oraz stężenie braku obserwowanego skutku (NOEC).

1.4. INFORMACJE O SUBSTANCJI TESTOWEJ

Należy dysponować metodą analityczną o należytej czułości do ilościowego oznaczenia substancji w pożywce.

Informacje o substancji testowej, które mogą być przydatne w ustaleniu warunków badania obejmują wzór strukturalny, czystość, rozpuszczalność w wodzie, trwałość w wodzie i świetle, pK_a , K_{ow} , ciśnienie pary oraz podatność na biodegradację. Rozpuszczalność w wodzie i ciśnienie pary mogą posłużyć do obliczenia stałej prawa Henry'ego, która wskaże, czy możliwe są znaczące straty substancji testowej w ciągu okresu badania. Pomoże to stwierdzić, czy powinny zostać podjęte szczególne kroki w celu ograniczenia takich strat. Gdy dane o rozpuszczalności i trwałości substancji testowej są niepewne, zaleca się, aby ocenić je w warunkach badania, przy uwzględnieniu pożywki wzrostowej, temperatury i warunków oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu.

Gdy szczególnie ważna jest kontrola pH pożywki, np. gdy bada się metale lub substancje, które są hydrolytycznie nietrwałe, zaleca się dodanie bufora do pożywki wzrostowej (zob. akapit pierwszy w sekcji 1.7.4). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych, które utrudniają ich badanie, podano w (11).

1.5. SUBSTANCJA ODNIESIENIA

Jako sposób sprawdzenia procedury badawczej można zbadać substancję(-e) odniesienia, taką jak 3,5-dwuchlorofenol używany w międzynarodowej próbie pierścieniowej (10). Wskazane jest testowanie substancji odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością, równoległe z określeniem toksyczności substancji testowej.

1.6. WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, czas podwojenia liczby liści w próbie kontrolnej musi być mniejszy niż 2,5 dnia (60 godz.), co odpowiada w przybliżeniu siedmiokrotnemu wzrostowi w ciągu siedmiu dni oraz średniej właściwej szybkości wzrostu wynoszącej $0,275 \text{ d}^{-1}$. Gdy używa się pożywki i badanie przeprowadzane jest w warunkach opisanych w niniejszej metodzie badawczej, kryterium to można spełnić stosując warunki badania statycznego (8). Przewiduje się również, że kryterium to będzie możliwe do spełnienia w warunkach badania półstatycznego i przepływowego. Obliczenie czasu podwojenia przedstawiono w sekcji 2.1.

1.7. OPIS METODY

1.7.1. Przyrząd

Cały sprzęt mający kontakt z pożywkami musi być wykonany ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Naczynia szklane używane do celów hodowli kultur i badania powinny być wolne od zanieczyszczeń chemicznych, które mogłyby zostać wypłukane do pożywki oraz powinny być sterylne. Naczynia badawcze powinny mieć dostateczną szerokość, tak aby liście różnych kolonii w naczyniach kontrolnych urosły bez zachodzenia na siebie na koniec badania. Nie ma znaczenia, czy korzenie dotykają dna naczyń badawczych, lecz zaleca się minimalną głębokość 20 mm i minimalną objętość 100 ml w każdym naczyniu badawczym. Wybór naczyń badawczych nie ma szczególnie ważnego znaczenia, o ile spełnione są te wymagania. Odpowiednie okazały się szklane zlewki, naczynia krystalizacyjne lub szalki Petriego o odpowiednich wymiarach. Naczynia badawcze muszą być przykryte, tak aby ograniczyć do minimum parowanie i przypadkowe zanieczyszczenie, przy jednoczesnym umożliwieniu niezbędnej wymiany powietrza. Odpowiednie naczynia badawcze, a w szczególności pokrywy, nie powinny dopuszczać do zaciemnienia lub zmian charakterystyki widmowej światła.

Kultury i naczynia badawcze nie powinny być trzymane razem. Najlepiej można to zapewnić, używając oddzielnych klimatycznych komór wzrostowych, inkubatorów lub pomieszczeń. Oświetlenie i temperatura muszą być regulowane i utrzymywane na stałym poziomie (zob. sekcja 1.7.8).

1.7.2. **Badany organizm**

Organizmem użytym do niniejszego badania jest *Lemna gibba* lub *Lemna minor*. Krótkie opisy gatunków rzęsy wodnej, których użyto do badania toksyczności, zamieszczono w dodatku 1. Materiał roślinny można uzyskać z kolekcji kultur, z innego laboratorium lub z terenu. Jeżeli rośliny są zebrane z terenu, to przed użyciem należy je trzymać przez co najmniej osiem tygodni w kulturze w tej samej pożywce, co użyta do badania. Miejsca w terenie wykorzystane do zebrania początkowych kultur muszą być wolne od wyraźnych źródeł zanieczyszczenia. Jeżeli uzyskane są one z innego laboratorium lub z kolekcji kultur, to powinny być trzymane w podobny sposób przez co najmniej trzy tygodnie. W sprawozdaniu należy zawsze podać źródło materiału roślinnego oraz gatunek i klon (jeśli jest znany) użyty do badania.

Należy użyć monokultur, które są w sposób widoczny wolne od zanieczyszczenia innymi organizmami, takimi jak glony i pierwotniaki. Zdrowe rośliny *L. minor* składać się będą z kolonii zawierających od dwóch do pięciu liści, podczas gdy zdrowe kolonie *L. gibba* mogą zawierać do siedmiu liści.

Jakość i jednorodność roślin użytych do badania będzie mieć znaczący wpływ na jego wynik i dlatego powinny one być wybierane ze starannością. Należy używać młodych, szybko rosnących roślin bez widocznych zmian chorobowych lub odbarwienia (chlorozy). O dobrej jakości kultur świadczy duża częstość występowania kolonii zawierających co najmniej dwa liście. Duża liczba pojedynczych liści oznacza stres środowiskowy, np. ograniczenie składników odżywczych i materiału roślinnego z takich kultur nie należy używać do badania.

1.7.3. **Hodowla**

Aby zmniejszyć częstotliwość utrzymania kultur (np. gdy przez pewien okres nie planuje się badań nad *Lemna*), kultury można utrzymywać w warunkach zmniejszonego oświetlenia i obniżonej temperatury (4–10 °C). Szczegóły dotyczące hodowli kultury podano w dodatku 2. Wyraźne oznaki zanieczyszczenia glonami lub innymi organizmami wymagać będą powierzchniowej sterylizacji podpróbki liści *Lemna*, a następnie przeniesienia jej do świeżej pożywki (zob. dodatek 2). W takim przypadku pozostałą zanieczyszczoną kulturę należy odrzucić.

Co najmniej siedem dni przed badaniem, dostateczną ilość kolonii przenosi się aseptycznie do świeżej sterylnej pożywki i przez 7–10 dni hoduje się kulturę w warunkach badania.

1.7.4. **Pożywka**

Dla *Lemna minor* i *Lemna gibba* zalecane są różne pożywki, jak opisano poniżej. Należy dokładnie rozważyć włączenie bufora pH do pożywki (MOPS (kwasu 4-morfolinopropanosulfonowego, nr CAS 1132–61–2; nr EINECS 214–478–5) w pożywce *L. minor* oraz NaHCO₃ w pożywce *L. gibba*), gdy podejrzewa się, że mógłby on reagować z substancją testową i wpłynąć na wyrażenie jej toksyczności. Dopuszczalna jest również pożywka Steinberga (12), o ile spełnione są kryteria ważności.

Do hodowli kultur i badania *L. minor* zalecana jest modyfikacja pożywki wzrostowej *Lemna* według normy szwedzkiej (SIS). Skład tej pożywki podano w dodatku 3.

Do hodowli kultur i badania *L. gibba* zaleca się pożywkę wzrostową 20X AAP, opisaną w dodatku 3.

Pożywka Steinberga, opisana w dodatku 3, jest również odpowiednia dla *L. minor*, lecz może być także użyta do *L. gibba*, o ile spełnione są kryteria ważności.

1.7.5. **Roztwory testowe**

Roztwory testowe sporządza się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe substancji testowej sporządza się zwykle przez rozpuszczenie substancji w pożywce wzrostowej.

Najwyższe badane stężenie substancji zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności tej substancji w wodzie w warunkach badania. Należy jednak zauważyć, że gatunki *Lemna* unoszą się na powierzchni i mogą być wyekspozowane na substancje, które gromadzą się na granicy faz woda-powietrze (jak np. substancje słabo rozpuszczalne w wodzie lub hydrofobowe bądź substancje powierzchniowo czynne). W takiej sytuacji ekspozycja będzie wynikać z substancji innej niż będąca w roztworze i stężenia próbne mogą, w zależności od charakterystyki substancji testowej, przekroczyć rozpuszczalność w wodzie. W przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne sporządzenie stężonego roztworu podstawowego lub dyspersji substancji przy

użyciu rozpuszczalnika organicznego lub dyspergatora. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich substancji. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub dyspergatorów nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład, do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do $100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ należy aceton i dwumetyloformamid. Jeżeli użyty jest rozpuszczalnik lub dyspergator, to w sprawozdaniu należy podać jego końcowe stężenie, które powinno być utrzymane na minimalnym poziomie ($\leq 100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$) i we wszelkich zabiegach i próbach kontrolnych powinno być zachowane takie samo stężenie rozpuszczalnika i dyspergatora. Dalsze wskazówki na temat użycia dyspergatorów podano w (11).

1.7.6. Grupy badane i kontrolne

W doborze odpowiednich stężeń testowych pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności substancji testowej w stosunku do *Lemna*, np. z próby wyznaczenia zakresu. W ostatecznym badaniu toksyczności powinno zwykle być co najmniej pięć stężeń testowych uporządkowanych w postaci szeregu geometrycznego. Współczynnik rozdziału pomiędzy stężeniami testowymi w miarę możliwości nie powinien przekraczać 3,2, lecz może być zastosowana większa wartość, gdy krzywa stężenie-odpowiedź jest płaska. Jeżeli użyto poniżej pięciu stężeń, należy podać uzasadnienie. Przy każdym stężeniu testowym należy użyć co najmniej trzy replikaty.

Przy ustalaniu zakresu stężeń (w przypadku próby wyznaczenia zakresu i/lub ostatecznego badania toksyczności), należy wziąć pod uwagę, co następuje:

- Aby określić EC_x , stężenia testowe powinny zawierać w swoim zakresie wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufnosci. Na przykład, jeżeli oszacowuje się EC_{50} , to najwyższe stężenie nie powinno być większe od wartości EC_{50} . Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem stężeń testowych, to związane z tym poziomy ufnosci będą większe i odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa.
- Jeżeli celem jest oszacowanie LOEC/NOEC, to najniższe stężenie testowe powinno być dostatecznie niskie, aby wzrost nie był znacząco mniejszy niż wzrost grupy kontrolnej. Ponadto najwyższe stężenie testowe powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Jeśli nie jest to spełnione, to badanie będzie musiało zostać powtórzone przy zastosowaniu innego zakresu stężeń (chyba, że najwyższe stężenie równe jest granicznej rozpuszczalności lub maksymalnemu wymaganemu stężeniu granicznemu, np. $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Każde badanie powinno obejmować próby kontrolne obejmujące tę samą pożywkę, liczbę liści i kolonii, warunki środowiskowe i procedury, w postaci naczyń badawczych, lecz bez substancji testowej. Jeżeli użyty jest pomocniczy rozpuszczalnik lub dyspergator, należy objąć dodatkową próbę kontrolną z użyciem rozpuszczalnika/dyspergatora o tym samym stężeniu, co w naczyniach z substancją testową. Liczba replikacyjnych naczyń kontrolnych (oraz, w stosownym wypadku, naczyń z rozpuszczalnikiem) powinna być co najmniej równa, a najlepiej dwukrotnie większa od liczby naczyń użytych do każdego stężenia testowego.

Jeżeli nie jest wymagane wyznaczenie NOEC, to plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę replikatów przypadających na stężenie. Jednakże liczba replikatów kontrolnych musi wynosić co najmniej trzy.

1.7.7. Ekspozycja

Kolonie składające się z 2–4 widocznych liści przenosi się z kultury inokulum i losowo przydziela do naczyń badawczych w warunkach aseptycznych. Każde naczynie badawcze powinno zawierać łącznie 9–12 liści. Liczba liści i kolonii powinna być taka sama w każdym naczyniu. Doświadczenie uzyskane z niniejszej metody oraz z danych z próby pierścieniowej wykazało, że użycie trzech replikatów na próbę, z każdym replikatem zawierającym początkowo 9–12 liści, jest wystarczające do wykrycia różnic we wzroście wynoszących w przybliżeniu 4–7 % inhibicji obliczonego na podstawie szybkości wzrostu (10–15 % obliczonego na podstawie uzysku) pomiędzy próbami (10).

Wymagany jest zrandomizowany plan umieszczania naczyń badawczych w inkubatorze, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic natężenia światła i temperatury. Wymagany jest również zblokowany plan lub losowe przestawianie naczyń podczas dokonywania obserwacji (lub częstsze przestawianie).

Jeżeli wstępna próba stabilności wykazuje, że nie można utrzymać stężenia substancji testowej (tj. mierzone stężenie spada poniżej 80 % zmierzonego początkowego stężenia) w czasie trwania badania (7 dni), zalecane są warunki badania półstatycznego. W takim przypadku kolonie należy wyeksponować na świeżo sporządzone roztwory testowe i kontrolne co najmniej dwukrotnie w ciągu badania (np. w dniach 3 i 5). Częstotliwość ekspozycji na świeżą pożywkę zależy będzie od stabilności substancji testowej; do utrzymania prawie stałych stężeń wysoce niestabilnych lub lotnych substancji może być wymagana większą częstotliwość. W niektórych sytuacjach może być wymagana procedura przepływowa (11)(13).

Scenariusz ekspozycji poprzez nałożenie na liście (natrysk) nie jest objęty niniejszą metodą badawczą; można natomiast znaleźć go w (14).

1.7.8. Warunki inkubacji

Należy zastosować ciągłe oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego światła fluorescencyjnego o natężeniu wybranym z zakresu $85\text{--}135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, zmierzonym w promieniowaniu aktywnym dla fotosyntezy (400–700 nm) w punktach o takiej samej odległości od źródła światła, co liście *Lemna* (równoważnym 6 500–10 000 luksów). Wszelkie różnice w stosunku do wybranego natężenia światła na badanej powierzchni nie powinny przekraczać $\pm 15\%$. Na mierzoną wartość będzie mieć wpływ metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika. Przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło ze wszystkich kątów powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe” (które reagują na światło ze wszystkich kątów powyżej płaszczyzny pomiaru) nad czujniki jednokierunkowe i będą one dawać wyższe wskazania dla opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w ciągu badania o więcej niż 1,5 jednostki. Jednakże odchylenie o więcej niż 1,5 jednostki nie spowoduje unieważnienia badania, jeśli można wykazać, że spełnione są kryteria ważności. Dodatkowej uwagi wymaga dryft pH w szczególnych przypadkach, takich jak podczas badania nietrwałych substancji lub metali. Dalsze wskazówki przedstawiono w (11).

1.7.9. Czas trwania

Badanie zostaje zakończone po 7 dniach od przeniesienia roślin do naczyń badawczych.

1.7.10. Pomiary i oznaczenia analityczne

Na początku badania liczy się i rejestruje liczbę liści w naczyniach badawczych, zwracając uwagę na uwzględnienie wystających, wyraźnie widocznych liści. Liczbę liści wydających się wyglądać normalne lub nienormalne należy określić na początku badania, co najmniej raz na 3 dni w ciągu okresu ekspozycji (tj. co najmniej 2 razy podczas 7-dniowego okresu) oraz na zakończenie badania. Należy odnotować zmiany w rozwoju roślin, np. pod względem wielkości liści, wyglądu, oznak martwicy, chlorozy lub garbatości, rozbicia kolonii lub utraty zdolności utrzymywania się na powierzchni wody oraz długości i wyglądu korzeni. Należy również odnotować istotne cechy pożywki (np. obecność nierozpuszczonej substancji, wzrost glonów w naczyniu badawczym).

Oprócz określenia liczby liści w ciągu badania ocenia się również wpływy substancji testowej na jedną (lub więcej) następujących zmiennych pomiarowych:

- (i) całkowitą powierzchnię liści;
- (ii) ciężar masy suchej;
- (iii) ciężar masy świeżej.

Całkowita powierzchnia liści ma tę zaletę, że może być określona dla każdego naczynia badawczego i kontrolnego na początku, podczas i na koniec badania. Ciężar masy suchej lub świeżej należy wyznaczyć na początku badania na podstawie próbki kultury inokulum reprezentatywnej dla tego, co jest użyte do rozpoczęcia badania, oraz na końcu badania przy użyciu materiału roślinnego z każdego naczynia badawczego i kontrolnego. Jeśli nie mierzy się powierzchni liści, to przedkłada się ciężar masy suchej nad ciężar masy świeżej.

Całkowitą powierzchnię liści oraz ciężar masy suchej i ciężar masy świeżej można wyznaczyć następująco:

- (i) Całkowita powierzchnia liści: całkowitą powierzchnię liści wszystkich kolonii można określić za pomocą analizy obrazu. Sylwetkę naczynia badawczego i liści można uchwycić za pomocą kamery wideo (np. ustawiając naczynie na kopioramie), a otrzymany w wyniku obraz poddać digitalizacji. Poprzez kalibrację za pomocą płaskich kształtów o znanej powierzchni można następnie wyznaczyć całkowitą powierzchnię liści w naczyniu badawczym. Należy pamiętać, aby wykluczyć zakłócenie spowodowane przez obrzeże naczynia badawczego. Alternatywne, choć bardziej pracochłonne podejście, polega na wykonaniu fotokopii wszystkich naczyń badawczych i roślin, wycięciu otrzymanej sylwetki kolonii i wyznaczeniu ich powierzchni przy użyciu analizatora powierzchni liści lub papieru milimetrowego. Odpowiednie mogą być również inne techniki (np. określenie stosunku ciężaru papieru powierzchni sylwetki kolonii do powierzchni jednostkowej).
- (ii) Ciężar masy suchej: z każdego naczynia badawczego zbiera się wszystkie kolonie i przepłukuje się wodą destylowaną lub dejonizowaną. Odsącza się je bibułą w celu usunięcia nadmiaru wody, a następnie suszy w temperaturze 60 °C do stałej masy. Należy dołączyć wszelkie fragmenty korzeni. Ciężar suchej masy należy wyrazić z dokładnością co najmniej do 0,1 mg.
- (iii) Ciężar masy świeżej: wszystkie kolonie przenosi się do uprzednio zważonych probówek z polistyrenu (lub innego obojętnego materiału) z małymi (1 mm) otworami w zaokrąglonym dnie. Następnie probówki odwirowuje się z prędkością 3 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Probówki zawierające wysuszone kolonie ponownie waży się i oblicza się ciężar masy świeżej przez odjęcie ciężaru pustej probówki.

1.7.10.1. Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

Jeżeli zastosowany jest statyczny plan badania, to należy zmierzyć pH każdej próby na początku i na końcu badania. Jeżeli zastosowany jest półstatyczny plan badania, to należy zmierzyć pH w każdej partii „świeżego” roztworu testowego przed każdą wymianą oraz w odpowiednich „zużytych” roztworach.

Natężenie światła należy zmierzyć w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu w różnych punktach o takiej samej odległości od źródła światła, co liście *Lemma*. Pomiaru należy dokonać co najmniej raz w ciągu badania. Temperaturę pożywki w naczyniu zastępczym utrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu należy rejestrować co najmniej codziennie.

Podczas badania, w odpowiednich ostępach czasu oznacza się stężenia substancji testowej. W badaniach statycznych minimalnym wymogiem jest oznaczenie stężeń na początku i na końcu badania.

W badaniach półstatycznych, gdzie nie jest spodziewane, że stężenie substancji testowej pozostanie w granicach $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, niezbędne jest zanalizowanie wszystkich świeżo sporządzonych roztworów oraz tych samych roztworów przy każdej wymianie (zob. akapit trzeci w sekcji 1.7.7). Jednakże w przypadku badań, gdzie zmierzone początkowe stężenie substancji testowej nie mieści się w granicach $\pm 20\%$ nominalnego, lecz gdzie można dostarczyć dostatecznych dowodów wykazujących, że początkowe stężenia są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % początkowego stężenia), oznaczenia chemiczne można przeprowadzać tylko na najwyższych i najniższych stężeniach testowych. We wszystkich przypadkach, oznaczenie stężeń substancji testowej przed wymianą musi być wykonane tylko na jednym replikatowym naczyniu przy każdym stężeniu testowym (lub zawartościach naczyń połączonych z sobą według replikatu).

Jeżeli zastosowana jest badanie przepływowo, to odpowiednim systemem jest system pobierania próbek podobny do opisanego dla badań półstatycznych, wraz z analizą na początku, w środku i na końcu badania, oraz pomiar „zużytych” roztworów nie jest odpowiedni w tym przypadku. W tego typu badaniu należy codziennie sprawdzać natężenie przepływu rozcieńczalnika i substancji testowej lub roztworu podstawowego substancji testowej.

Jeżeli istnieją dowody, że stężenie substancji testowej zostało zadowalająco utrzymane w granicach $\pm 20\%$ nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych początkowych wartościach. Jeżeli odchylenie od nominalnych lub zmierzonych początkowych stężeń jest większe niż $\pm 20\%$, analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu podczas ekspozycji lub na modelach opisujących spadek stężenia substancji testowej (11).

1.7.11. Badanie graniczne

W pewnych okolicznościach, np. gdy wstępne badanie wskazuje, że substancja testowa nie ma toksycznych oddziaływań przy stężeniach do $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ lub do jej granicznej rozpuszczalności w pożywce (zależnie od tego, co jest mniejsze), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu odpowiedzi w grupie kontrolnej i jednej grupie poddawanej zabiegowi (o stężeniu $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ lub równym rozpuszczalności granicznej). Bardzo zalecane jest, aby było to poparte analizą stężenia ekspozycji. Do badania granicznego stosują się wszystkie poprzednio opisane warunki badania i kryteria ważności, poza tym że liczba replikatów poddawanych zabiegowi powinna być dwukrotnie zwiększona. Wzrost w grupie kontrolnej i poddawanej zabiegowi można zanalizować przy pomocy testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t Studenta.

2. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

2.1. CZAS PODWOJENIA

Aby określić czas podwojenia (T_d) liczby liści oraz spełnienie przez badanie niniejszego kryterium ważności (sekcja 1.6), używa się poniższego wzoru z danymi uzyskanymi z naczyń kontrolnych:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

gdzie μ jest średnią właściwą szybkością wzrostu wyznaczoną w sposób opisany w akapicie pierwszym i drugim w sekcji 2.2.1.

2.2. ZMIENNE ODPOWIEDZI

Celem badania jest określenie wpływów substancji testowej na wegetatywny wzrost *Lemma*. Niniejsza metoda badawcza opisuje dwie zmienne odpowiedzi, gdyż państwa członkowskie mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były akceptowalne we wszystkich państwach członkowskich, skutki powinny być ocenione przy użyciu obydwu zmiennych odpowiedzi a) i b) opisanych poniżej.

- a) Średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną odpowiedzi oblicza się na podstawie zmian logarytmów liczb liści, a ponadto na podstawie zmian logarytmów innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści oraz ciężaru masy suchej lub ciężaru masy świeżej) w czasie (wyrażonych na dzień) w grupach kontrolnych i w każdej grupie poddawanej zabiegowi. Niekiedy określa się ją mianem względnej szybkości wzrostu (15).
- b) Uzysk: tę zmienną odpowiedzi oblicza się na podstawie zmian liczby liści, a ponadto na podstawie zmian innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści oraz ciężaru masy suchej lub ciężaru masy świeżej) w grupach kontrolnych i w każdej grupie poddawanej zabiegowi, aż do końca badania.

Należy zauważyć, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwu zmiennych odpowiedzi nie są porównywalne i różnica ta musi być rozpoznana, gdy używa się wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, to wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) bywają zwykle wyższe od wyników opartych na uzysku (E_yC_x), ze względu na podstawę matematyczną odnośnych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy czułości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi odpowiedzi, lecz jedynie, że wartości te są różne matematycznie. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu oparte jest na ogólnym wykładniczym przebiegu wzrostu rzęsy w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność szacowana jest na podstawie wpływów na szybkość wzrostu, nie będąc zależną od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu kultury kontrolnej, nachylenia krzywej stężenie-odpowiedź lub czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte na zmiennej odpowiedzi w postaci uzysku są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. E_yC_x jest zależne od właściwej szybkości wzrostu gatunków rzęsy użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych szczepów. Tej zmiennej odpowiedzi nie powinno się używać do porównywania czułości na czynniki toksyczne pomiędzy gatunkami rzęsy lub nawet różnymi ich szczepami. Choć z naukowego punktu widzenia do szacowania toksyczności preferowane jest posługiwanie się średnią właściwą szybkością wzrostu, to oszacowania toksyczności na podstawie uzysku są również objęte niniejszą metodą badawczą, aby uczynić zażość obecnym wymogom regulacyjnym istniejącym w niektórych krajach.

Oszacowania toksyczności powinny być oparte na liczbie liści oraz na dodatkowych zmiennych pomiarowych (całkowitą powierzchnię liści, ciężar masy suchej lub ciężar masy świeżej), ponieważ niektóre substancje mogą mieć znacznie większy wpływ na inne zmienne pomiarowe niż na liczbę liści. Skutek ten nie zostałby wykryty jedynie przez obliczenie liczby liści.

Liczba liści, jak również każda inna rejestrowana zmienna pomiarowa, tj. całkowita powierzchnia liści, ciężar masy suchej lub ciężar masy świeżej, jest zapisywana w postaci tabelarycznej wraz ze stężeniami substancji testowej podczas każdego pomiaru. Późniejsza analiza danych, np. w celu oszacowania LOEC, NOEC lub EC_x, powinna być oparta na wartościach dla indywidualnych replikatów, a nie na obliczonych średnich dla każdej grupy poddawanej zabiegowi.

2.2.1. Średnia właściwa szybkość wzrostu

Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost zmiennych wzrostu — liczb liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, ciężaru masy suchej lub ciężaru masy świeżej) — przy użyciu poniższego wzoru, dla każdego replikatu grupy kontrolnej i grup poddawanych zabiegowi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

- μ_{i-j} : średnia właściwa szybkość wzrostu od czasu i do j,
- N_i : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,
- N_j : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,
- t: okres od czasu i do j.

Dla każdej grupy poddawanej zabiegowi i grupy kontrolnej obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i” w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j” jest końcem badania). Dla każdego stężenia testowego i próby kontrolnej obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Ponadto należy ocenić szybkość wzrostu według odcinków, aby określić skutki substancji testowej występujące w czasie okresu ekspozycji (np. przez badanie krzywych wzrostu przekształconych na postać logarytmiczną). Znaczące różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnią szybkością wzrostu świadczą o odchyleniu od stałego wykładniczego wzrostu i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu. W takim przypadku rozsądnym podejściem byłoby porównanie właściwych szybkości wzrostu uzyskanych z kultur poddawanych zabiegowi w ciągu okresu maksymalnej inhibicji z właściwymi szybkościami wzrostu dla kultur kontrolnych w ciągu tego samego okresu.

Następnie można obliczyć procentową inhibicję szybkości wzrostu (I_r) dla każdego stężenia testowego (grupy poddawanej zabiegowi), według następującego równania:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

gdzie:

- $\%I_r$: procentowa inhibicja średniej właściwej szybkości wzrostu,
- μ_c : średnia wartość μ w grupie kontrolnej,
- μ_T : średnia wartość μ w grupie poddawanej zabiegowi.

2.2.2. Uzysk

Wpływy na uzysk określa się na podstawie dwu zmiennych pomiarowych: liczby liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, ciężaru masy suchej lub ciężaru masy świeżej) istniejących w każdym naczyniu badawczym na początku i na końcu badania. Dla ciężaru masy suchej lub ciężaru masy świeżej początkową biomasa określa się na podstawie próbki liści pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyni badawczych (zob. akapit drugi w sekcji 1.7.3). Dla każdego stężenia testowego i grupy kontrolnej obliczyć

średnią wartość uzysku wraz z oszacowaniami wariancji. Średnie procentowe inhibicji uzysku (% I_y) można obliczyć dla każdej poddawanej zabiegowi grupy w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

gdzie:

- % I_y : procentowe zmniejszenie uzysku,
- b_c : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej,
- b_T : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy poddawanej zabiegowi.

2.2.3. Wykreślanie krzywych stężenie-odpowiedź

Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnią procentową inhibicję zmiennej odpowiedzi (I_y , lub I_y obliczone jak pokazano w ostatnim akapicie sekcji 2.2.1 lub w sekcji 2.2.2) i logarytm stężenia substancji testowej.

2.2.4. Oszacowanie EC_x

Oszacowania EC_x (np. EC_{50}) powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) jak i na uzysku (E_yC_x), z których każde powinno być oparte na liczbie liści oraz jednej dodatkowej zmiennej pomiarowej (całkowitą powierzchnią liści, ciężar masy suchej lub ciężar masy świeżej). Wynika to stąd, że istnieją takie substancje testowe, które wpływają różnie na liczbę liści i inne zmienne pomiarowe. Żądanymi parametrami toksyczności są więc cztery wartości EC_x dla każdego obliczonego poziomu inhibicji x : E_rC_x (liczba liści); E_yC_x (całkowita powierzchnia liści, ciężar masy suchej lub ciężar masy świeżej); E_yC_x (liczba liści); oraz E_yC_x (całkowita powierzchnia liści, ciężar masy suchej lub ciężar masy świeżej).

2.3. PROCEDURY STATYSTYCZNE

Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu linearyzującej transformacji danych odpowiedzi — na przykład do jednostek probit lub logit albo Weibulla (16), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej znoszą nieuniknione nieregularności danych i odchylenia od gładkich rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowej lub do całkowitej inhibicji, nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (16). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit lub Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych kwantalowych (np. śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane z dostosowaniem do danych szybkości wzrostu lub biomasy. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (17), (18) i (19).

Dla każdej zmiennej odpowiedzi, która ma być analizowana, należy użyć zależności stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności 95 %. Dokładność dopasowania danych odpowiedzi do modelu regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić, używając odpowiedzi indywidualnych replikatów zamiast średnich z grup poddawanych zabiegowi.

Oszacowania EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z ładowaniem początkowym (20), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie dla danych.

W celu oszacowania LOEC, a stąd NOEC, konieczne jest porównanie średnich z grup poddawanych zabiegowi przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williamsa (21)(22)(23)(24). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie homogeniczności wariancji pozostaje w mocy. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie lub za pomocą formalnego testu (25). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o homogeniczności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą logarytmicznego przekształcenia danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji jest skrajnie duża i nie może być skorygowana przez transformację, to należy rozważyć analizę za pomocą metod takich, jak testy trendu stopniowego obniżania Jonkheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (19).

Rozwój naukowy, jaki ostatnio nastąpił, doprowadził do zalecenia zarzucenia pojęcia NOEC i zastąpienia go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi EC_x . Dla niniejszego badania *Lemma* nie ustalono odpowiedniej wartości x . Jednakże, odpowiednim wydaje się przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej odpowiedzi), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10} jak i EC_{20} .

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Substancja testowa:

- fizyczny charakter i własności fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (np. numer CAS), w tym czystość.

Badane gatunki:

- nazwa naukowa, klon (jeśli jest znany) oraz źródło.

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (statyczna, półstatyczna lub przepływowa),
- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania,
- pożywka,
- opis planu doświadczalnego: naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, liczba kolonii i liści przypadających na naczynie badawcze na początku badania,
- stężenia testowe (nominalne i zmierzone, gdy stosowne) oraz liczba replikatów na stężenie,
- metody sporządzania roztworów podstawowych i testowych, w tym użycie ewentualnych rozpuszczalników lub dyspergatorów,
- temperatura podczas badania,
- źródło światła, natężenie i jednorodność światła,
- wartości pH pożywki testowej i kontrolnej,
- stężenia substancji testowej oraz metoda analizy wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz),
- metody określania liczby liści i innych zmiennych pomiarowych, np. ciężaru masy suchej, ciężaru masy świeżej lub powierzchni liści,
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki:

- dane pierwotne: liczba liści oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i okazji analizy,
- średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej,
- krzywe wzrostu dla każdego stężenia (zalecane ze zmienną pomiarową przekształconą do postaci logarytmicznej, zob. akapit drugi w sekcji 2.2.1),
- czas podwojenia/szybkość wzrostu w grupie kontrolnej na podstawie liczby liści,

- obliczone zmienne odpowiedzi dla każdego replikatu poddawanemu zabiegowi, wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla replikatów,
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek,
- oszacowania punktów końcowych toksyczności dla zmiennych odpowiedzi, np. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} oraz związane z nimi przedziały ufności. W przypadku obliczenia — LOEC i/lub NOEC oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia,
- jeżeli zastosowana została ANOVA — wielkość skutku, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica),
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie,
- wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów testowych,
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania wynikający z odstępstw od niniejszej metody badawczej.

4. LITERATURA

- (1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test.
- (2) Wykorzystanie badań Lemna w odniesieniu do zabarwionych substancji opisano w sekcji 13.5.3 Podręcznika decyzji UE z lipca 2006 r., dostępnego pod adresem <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals>.
- (3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, dostępny pod adresem http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A
- (4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). pp. 733–742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96–156. 8pp.
- (6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).
- (8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37–120 pp.
- (9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- (11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.
- (12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3–77 108. September 1977.
- (14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353–359.

- (15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.
 - (16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): *Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves*. *Env. Sci. Technol.* 19, 713–718.
 - (17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157–167.
 - (18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485–1494.
 - (19) OECD. (2004). *Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*.
 - (20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.
 - (21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096–1121.
 - (22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
 - (23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103–117.
 - (24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510–531.
 - (25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.
-

Dodatek 1

Opis gatunków *Lemna*

Roślina wodna powszechnie zwana rzęsą, obejmująca gatunki *Lemna*, należy do rodziny *Lemnaceae*, na którą składa się szereg występujących na całym świecie gatunków w czterech rodzajach. Ich różny wygląd i taksonomia zostały wyczerpująco opisane (1)(2). *Lemna gibba* i *L. minor* są gatunkami reprezentatywnymi dla obszarów o klimacie umiarkowanym i są powszechnie używane do badań toksyczności. Obydwa gatunki mają pływającą lub zanurzoną tarczową łodygę (liść) i bardzo cienkie wypustki korzenia wychodzące ze środka dolnej powierzchni każdego liścia. Gatunki *Lemna* rzadko wytwarzają kwiaty i rośliny rozmnażają się poprzez wegetatywne wytwarzanie nowych liści (3). W porównaniu do starszych roślin młode rośliny bywają zazwyczaj bledsze, mają krótsze korzenie i składają się z dwóch do trzech liści o różnych rozmiarach. Mały rozmiar gatunku *Lemna*, jego prosta budowa, bezpieczne rozmnażanie się oraz krótki czas trwania pokolenia sprawiają, że rośliny tego rodzaju są bardzo dogodne do badań laboratoryjnych (4)(5).

Z powodu prawdopodobnej zmienności międzygatunkowej pod względem wrażliwości ważne są jedynie porównania czułości w obrębie gatunku.

Przykłady gatunków *Lemna*, które były używane do badań: źródła literaturowe dotyczące gatunków

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. Phys. Chem., 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96–156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Szwedzki Instytut Norm (SIS). (1995). Jakość wody — Wyznaczanie inhibicji wzrostu (7-d) rzęsy *Lemna minor*, SS 02 82 13. s. 15. (w języku szwedzkim).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). pp. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96–156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481–483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102–2111.

Źródła gatunków *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria (Kolekcja kulturowa glonów i cyjanobakterii Uniwersytetu w Toronto)

Department of Botany, University of Toronto (Wydział Botaniki Uniwersytetu w Toronto)

Toronto, Ontario, KANADA, M5S 3 B2

Tel.: +1-416-978-3641

Faks: +1-416-978-5878

e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

<http://www.botany.utoronto.ca/utcc>

North Carolina State University (Uniwersytet Stanu Północna Karolina)

Forestry Dept (Wydział Leśnictwa)

Duckweed Culture Collection (Kolekcja kulturowa rzęsy wodnej)

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695–8002

USA

Tel.: 001 (919) 515–7572

astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University (Instytut Badań Stosowanych nad Środowiskiem, Uniwersytet w Sztokholmie)
106 91 Sztokholm
SZWECJA
Tel.: +46 8 674 7240
Faks: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA) (Federalna Agencja Środowiskowa)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
NIEMCY
e-mail: lemna@uba.de
<http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

Literatura

- (1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221–287.
 - (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
 - (3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82–991150–0–0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
 - (4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1–14.
 - (5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7–22.
-

Dodatek 2

Utrzymanie kultury podstawowej

Kultury podstawowe mogą być utrzymywane w niskich temperaturach (4–10 °C) przez dłuższy okres bez konieczności odtworzenia. Pożywka wzrostowa dla gatunku *Lemna* może być taka sama jak używana do badań, lecz do kultur podstawowych można używać innych pożywek bogatych w składniki odżywcze.

Okresowo pewną ilość młodych, jasnozielonych roślin przenosi się do zawierających świeżą pożywkę naczyń przeznaczonych na nowe kultury, stosując technikę aseptyczną. W proponowanych tu chłodniejszych warunkach hodowanie podkultur można prowadzić w odstępach czasu wynoszących do trzech miesięcy.

Należy używać chemicznie czystych (przeplukanych kwasem) i sterylnych naczyń na nowe kultury oraz stosować sterylne techniki manipulacji. W razie zanieczyszczenia kultury podstawowej, np. glonami lub grzybami, należy podjąć kroki mające na celu wyeliminowanie zanieczyszczających organizmów. W przypadku glonów i większości innych zanieczyszczających organizmów można tego dokonać przez powierzchniową sterylizację. Pobiera się próbkę zanieczyszczonego materiału roślinnego i odcina się korzenie. Następnie materiał energicznie wytrząsa się w czystej wodzie, po czym zanurza się w 0,5 % (obj.) roztworze podchlorynu sodowego na czas od 30 sekund do 5 minut. Materiał roślinny następnie płucze się sterylną wodą i przenosi się, jako pewną liczbę partii, do przeznaczonych na kultury naczyń zawierających świeżą pożywkę wzrostową. Wiele liści obumrze w wyniku tego zabiegu, zwłaszcza jeśli stosowane będą dłuższe okresy ekspozycji, lecz niektóre spośród tych, które przeżyją, będą zazwyczaj wolne od zanieczyszczenia. Liście te można następnie użyć do ponownego zaszczipienia nowych kultur.

Dodatek 3

Pożywki

Dla *L. minor* i *L. gibba* zalecane są różne pożywki wzrostowe. Dla *L. minor* zaleca się zmodyfikowaną pożywkę według Normy Szwedzkiej (SIS), natomiast dla *L. gibba* zalecana jest pożywka 20X AAP. Składy obydwu pożywek podano poniżej. Przy sporządzaniu tych pożywek należy użyć substancji chemicznych gatunku odczynnikowego lub analitycznego oraz wody dejonizowanej.

Pożywka wzrostowa dla *Lemna* według Normy Szwedzkiej (SIS)

- Roztwory podstawowe I–V sterylizuje się przez obróbkę w autoklawie (120 °C, 15 minut) lub za pomocą filtracji przez przeponę (o wielkości porów około 0,2 µm).
- Roztwór podstawowy VI (i opcjonalnie VII) sterylizuje się wyłącznie przez filtrację przeponową; roztworów tych nie należy obrabiać w autoklawie.
- Sterylne roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. Roztwory podstawowe I–V należy usunąć po sześciu miesiącach, natomiast roztwory podstawowe VI (i opcjonalnie VII) mają dopuszczalny okres przechowywania wynoszący jeden miesiąc.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g·l ⁻¹)	Stężenie w sporządzonej pożywce (mg·l ⁻¹)	Sporządzona pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie (mg·l ⁻¹)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (bufor)	490	490	—	—

- Aby sporządzić jeden litr pożywki SIS, do 900 ml dejonizowanej wody dodaje się:

- 10 ml roztworu podstawowego I,
- 5 ml roztworu podstawowego II,
- 5 ml roztworu podstawowego III,
- 5 ml roztworu podstawowego IV,
- 1 ml roztworu podstawowego V,
- 5 ml roztworu podstawowego VI,
- 1 ml roztworu podstawowego VII (opcjonalnie).

Uwaga: Dla niektórych badanych substancji może być potrzebny dodatkowy roztwór podstawowy VII (bufor MOPS) (zob. ostatni akapit w sekcji 1.4).

- pH reguluje się do 6,5 ± 0,2 przy użyciu 0,1 lub 1 molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej.

Pożywka wzrostowa 20X AAP

Roztwory podstawowe sporządza się w sterylnej wodzie destylowanej lub dejonizowanej.

Sterylny roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. W takich warunkach, dopuszczalny okres przechowywania roztworów podstawowych wynosić będzie co najmniej 6–8 tygodni.

Dla pożywki 20X AAP sporządza się pięć roztworów podstawowych składników odżywczych (A1, A2, A3, B i C), używając substancji chemicznych gatunku odczynnikowego. 20 ml każdego roztworu podstawowego składników odżywczych dodaje się do około 850 ml dejonizowanej wody, tworząc pożywkę wzrostową. pH reguluje się do $7,5 \pm 0,1$ przy użyciu 0,1 lub 1 molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej. Pożywkę następnie przefiltrowuje się przez filtr przeponowy (ok.) 0,2 μm do sterylnego pojemnika.

Pożywkę wzrostową przeznaczoną do badań należy sporządzić 1–2 dni przed użyciem, aby pozwolić na ustabilizowanie się pH. Przed użyciem należy sprawdzić i wyregulować, w razie potrzeby, pH pożywki wzrostowej przez dodanie 0,1 lub 1 M NaOH albo HCl, jak opisano powyżej.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) (*)	Stężenie w sporządzonej pożywce ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (*)	Sporządzona pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (*)
A1	NaNO_3	26	510	Na; N	190; 84
	$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	240	Mg	58,08
	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	290	S	38,22
A3	$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,30	6,0	—	—
	ZnCl_2	$3,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$66 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Zn	$31 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$29 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Co	$7,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$7,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$145 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Mo	$58 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
C	$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,012 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,24 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cu	$0,080 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
C	NaHCO_3	15	300	Na; C	220; 43

(*) O ile nie podano inaczej.

Przypis: Teoretycznie odpowiednie końcowe stężenie wodorowęglanu (które pozwoli uniknąć znacznej regulacji pH) wynosi 15 mg/l, a nie 300 mg/l. Jednakże historyczne stosowanie odżywki 20X AAP, w tym w próbie pierścieniowej dla niniejszej metody, oparte jest na stężeniu 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse i R. Lacey. (1999) The OECD *Lemma* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRC plc — Environmental Agency).

Pożywka STEINBERGA (za ISO 20079)*Stężenia i roztwory podstawowe*

- Zmodyfikowana pożywka Steinberga zastosowana jest w ISO 20079 dla samego *Lemma minor* (gdyż tylko *Lemma minor* jest tam dopuszczona), lecz próby wykazały, iż można uzyskiwać dobre wyniki również w przypadku *Lemma gibba*.
- Przy sporządzaniu pożywki należy użyć substancji chemicznych gatunku odczynnikowego lub analitycznego oraz wody dejonizowanej.
- Sporządzić odżywkę z roztworów podstawowych lub 10-krotnie zateżonej odżywki, co pozwala na maksymalne stężenie odżywki bez wytrącenia.

Tabela 1

Pożywka STEINBERGA o stabilizowanym pH (zmodyfikowana wg Altenburgera)

Substancja		Pożywka	
Makroelementy	masa cząsteczkowa	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Mikroelementy	masa cząsteczkowa	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	372,24	1 500,00	4,03

Tabela 2

Roztwory podstawowe (makroelementy)

1. Makroelementy (zatręzone 50-krotnie)	g/l
Roztwór podstawowy 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Roztwór podstawowy 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Roztwór podstawowy 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabela 3

Roztwory podstawowe (mikroelementy)

2. Mikroelementy (zatręzone 1 000-krotnie)	mg/l
Roztwór podstawowy 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Roztwór podstawowy 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Roztwór podstawowy 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
Roztwór podstawowy 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Roztwór podstawowy 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	1 500,00

- Roztwory podstawowe 2 i 3 oraz oddzielnie 4–7 można połączyć z sobą (biorąc pod uwagę wymagane stężenia).
- Aby zapewnić dłuższą przechowywalność roztworów podstawowych, należy poddać je obróbce w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 min lub, alternatywnie, przeprowadzić sterylną filtrację (0,2 µm). Dla roztworu podstawowego 8 zdecydowanie zaleca się sterylną filtrację (0,2 µm).

Sporządzenie pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) o stężeniu końcowym

- Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 900 ml wody dejonizowanej, aby uniknąć wytrącenia.
- Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3).
- pH powinno wynosić $5,5 \pm 0,2$ (wyregulować przez dodanie ograniczonej do minimum objętości roztworu NaOH lub HCl).
- Uzpełnić wodą do 1 000 ml.
- Jeżeli roztwory są wysterylizowane i użyta jest odpowiednia woda, to nie ma konieczności dalszej sterylizacji. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).

Sporządzenie 10-krotnie zatężonej pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) do średnioterminowego przechowywania

- Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 30 ml wody, aby uniknąć wytrącenia.
 - Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3). Uzpełnić wodą do 100 ml.
 - Jeżeli roztwory są wysterylizowane i użyta jest odpowiednia woda, to nie ma konieczności dalszej sterylizacji. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).
 - pH pożywki (końcowe stężenie) powinno wynosić $5,5 \pm 0,2$.
-