

Acest document reprezintă un instrument de documentare, iar instituțiile nu își asumă responsabilitatea pentru conținutul său.

► **B****REGULAMENTUL (CE) NR. 440/2008 AL COMISIEI**

**din 30 mai 2008**

**de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)**

**(Text cu relevanță pentru SEE)**

**(JO L 142, 31.5.2008, p. 1)**

Astfel cum a fost modificat prin:

|                    |  | Jurnalul Oficial |        |           |
|--------------------|--|------------------|--------|-----------|
|                    |  | NR.              | Pagina | Data      |
| ► <b><u>M1</u></b> | Regulamentul (CE) nr. 761/2009 al Comisiei din 23 iulie 2009     | L 220            | 1      | 24.8.2009 |
| ► <b><u>M2</u></b> | Regulamentul (UE) nr. 1152/2010 al Comisiei din 8 decembrie 2010 | L 324            | 13     | 9.12.2010 |
| ► <b><u>M3</u></b> | Regulamentul (UE) nr. 640/2012 al Comisiei din 6 iulie 2012      | L 193            | 1      | 20.7.2012 |
| ► <b><u>M4</u></b> | Regulamentul (UE) nr. 260/2014 al Comisiei din 24 ianuarie 2014  | L 81             | 1      | 19.3.2014 |
| ► <b><u>M5</u></b> | Regulamentul (UE) nr. 900/2014 al Comisiei din 15 iulie 2014     | L 247            | 1      | 21.8.2014 |
| ► <b><u>M6</u></b> | Regulamentul (UE) 2016/266 al Comisiei din 7 decembrie 2015      | L 54             | 1      | 1.3.2016  |



## REGULAMENTUL (CE) NR. 440/2008 AL COMISIEI

din 30 mai 2008

**de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)**

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei <sup>(1)</sup>, în special articolul 13 alineatul (3),

întrucât:

- (1) În conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1907/2006, se adoptă metode de testare la nivel comunitar în vederea testării substanțelor, atunci când astfel de teste sunt necesare pentru a obține informații privind proprietățile intrinsece ale substanțelor.
- (2) Directiva 67/548/CEE a Consiliului din 27 iunie 1967 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase <sup>(2)</sup> a stabilit, în anexa V, metodele de determinare a proprietăților fizico-chimice, a toxicității și a ecotoxicității substanțelor și preparatelor. Anexa V la Directiva 67/548/CEE a fost eliminată prin Directiva 2006/121/CE a Parlamentului European și a Consiliului cu începere de la 1 iunie 2008.
- (3) Metodele de testare prezentate în anexa V la Directiva 67/548/CEE trebuie incluse în prezentul regulament.
- (4) Prezentul regulament nu exclude utilizarea altor metode de testare, cu condiția ca aceasta să fie conformă cu articolul 13 alineatul (3) din Regulamentul 1907/2006.

<sup>(1)</sup> JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

<sup>(2)</sup> JO 196, 16.8.1967, p. 1. Directivă modificată ultima dată prin Directiva 2006/121/CE a Parlamentului European și a Consiliului (JO L 396, 30.12.2006, p. 850) – a se actualiza cu trimiterile corespunzătoare după publicarea celei de-a treizecea ATP.

**▼B**

- (5) La elaborarea metodelor de testare trebuie luate în considerare pe deplin principiile de înlocuire, de reducere și de perfecționare a utilizării animalelor în cadrul procedurilor, în special atunci când sunt disponibile metode corespunzătoare și validate de înlocuire, reducere sau perfecționare a testării pe animale.
- (6) Dispozițiile prezentului regulament sunt conforme cu avizul comitetului instituit în temeiul articolului 133 din Regulamentul (CE) nr. 1907/2006,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

*Articolul 1*

Metodele de testare care urmează să fie aplicate în sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 sunt prezentate în anexa la prezentul regulament.

*Articolul 2*

Comisia revizuieste, atunci când este cazul, metodele de testare incluse în prezentul regulament în vederea înlocuirii, reducerii sau perfecționării testelor efectuate pe animale vertebrate.

*Articolul 3*

Toate trimerile la anexa V la Directiva 67/548/CEE se interpretează ca trimeri la prezentul regulament.

*Articolul 4*

Prezentul regulament intră în vigoare în ziua următoare publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la 1 iunie 2008.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

**▼B***ANEXĂ***▼M6***Notă:*

Înainte de a utiliza oricare dintre următoarele metode de testare pentru a testa o substanță multi-constituentă (MCS), o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produs de reacție complex sau material biologic (UVCB) sau a unui amestec și în cazul în care aplicabilitatea sa pentru testarea MCS, UVCB sau a amestecurilor nu este indicată în respectiva metodă de testare, ar trebui văzut dacă metoda este adecvată pentru obiectivul de reglementare avut în vedere.

Dacă metoda de testare se utilizează pentru testarea MCS, UVCB sau a unui amestec, ar trebui puse la dispoziție suficiente informații despre compoziția sa, în măsura posibilului, de exemplu prin identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile relevante ale constituenților.

**▼B****PARTEA A: METODE PENTRU DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE****CUPRINS**

- A.1. PUNCTUL DE TOPIRE/CONGELARE
- A.2. PUNCTUL DE FIERBERE
- A.3. DENSITATEA RELATIVĂ
- A.4. PRESIUNEA DE VAPORI
- A.5. TENSIUNEA SUPERFICIALĂ
- A.6. SOLUBILITATEA ÎN APĂ
- A.8. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE
- A.9. PUNCTUL DE INFLAMABILITATE
- A.10. INFALMABILITATE (SOLIDE)
- A.11. INFLAMABILITATE (GAZE)
- A.12. INFLAMABILITATE (CONTACTUL CU APA)
- A.13. PROPRIETĂȚI PIROFORICE ALE SOLIDELOR ȘI ALE LICHIDELOR
- A.14. PROPRIETĂȚI EXPLOZIVE
- A.15. PUNCTUL DE AUTOAPRINDERE (LICHIDE ȘI GAZE)
- A.16. TEMPERATURA RELATIVĂ DE AUTOAPRINDERE PENTRU SUBSTANȚELE SOLIDE
- A.17. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (SOLIDE)
- A.18. DETERMINAREA MASEI MOLECULARE NUMERICE MEDII ȘI A DISTRIBUȚIEI MASELOR MOLECULARE A POLIMERILOR
- A.19. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN POLIMERI CU MASĂ MOLECULARĂ MICĂ
- A.20. COMPORTAMENTUL DE DIZOLVARE/EXTRACȚIE AL POLIMERILOR ÎN APĂ
- A.21. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (LICHIDE)
- A.22. DIAMETRU MEDIU GEOMETRIC PONDERAT PE LUNGIME AL FIBRELOR
- A.23. COEFICIENT DE PARTIȚIE (1-OCTANOL/APĂ): METODA AGITĂRII LENTE
- A.24. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE (N-OCTANOL/APĂ), METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)



**▼B****A.1. PUNCTUL DE TOPIRE/CONGELARE****1. METODĂ**

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt descrise în referințele bibliografice 2 și 3.

**1.1. INTRODUCERE**

Metodele și dispozitivele descrise se aplică pentru determinarea punctului de topire a substanțelor, oricare ar fi gradul de puritate a acestora.

Alegerea metodei depinde de natura substanței de testat. În consecință, factorul limitativ depinde direct de calitatea substanței de a fi ușor pulverizabilă, greu pulverizabilă sau nepulverizabilă.

Pentru anumite substanțe este preferabil să se determine punctul de congelare sau de solidificare. Acesta este motivul pentru care normele acestor determinări figurează și în prezenta metodă.

Atunci când, datorită proprietăților specifice ale substanței, niciun parametru nu poate fi măsurat într-un mod satisfăcător, se poate determina punctul de curgere.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Punctul de topire se definește ca temperatura la care are loc tranziția de fază din stare solidă în stare lichidă, la presiunea atmosferică, temperatură care în mod ideal corespunde temperaturii de congelare.

Deoarece în cazul multor substanțe tranziția de fază are loc într-un anumit interval de temperatură, aceasta este deseori descrisă ca interval de topire.

Transformarea unităților de măsură (K în °C)

$$t = T - 273,15$$

t = temperatura Celsius, exprimată în grade Celsius (°C)

T = temperatura termodinamică, exprimată în grade Kelvin (K)

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință de fiecare dată când se studiază o substanță nouă. Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateții metodei și să permită comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Câteva substanțe-mamă sunt enumerate în referințele bibliografice (4).

**▼B****1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Se determină temperatura (intervalul de temperatură) la care are loc tranziția de fază din starea solidă în starea lichidă. În practică, se determină temperaturile fazei inițiale de topire/congelare și finale de topire/congelare în timpul încălzirii/răcirii unei mostre de substanță la presiunea atmosferică. Sunt descrise cinci tipuri de metode, și anume: metoda capilară, metoda blocului fierbinte, determinarea punctului de congelare, metoda analizei termice și determinarea punctului de curgere (pentru uleiurile din petrol).

În anumite cazuri, poate fi mai ușor să se măsoare punctul de congelare în locul punctului de topire.

**1.4.1. Metoda tubului capilar****1.4.1.1. *Dispozitiv cu baie de lichid***

Se introduce o cantitate mică de substanță pulverizată fin într-un tub capilar și se tasează cu atenție. Se încălzește tubul în același timp cu un termometru și pe parcursul operației se reglează creșterea temperaturii cu puțin sub 1 K pe minut. Se înregistrează temperaturile la început și la sfârșit de topire.

**1.4.1.2. *Dispozitiv prevăzut cu bloc metalic fierbinte***

Metoda este aceeași cu cea descrisă la punctul 1.4.1.1, cu diferența că tubul capilar și termometrul sunt plasate într-un bloc de metal încălzit și observate prin orificii practicate în acest bloc.

**1.4.1.3. *Detecție fotoelectrică***

Eșantionul conținut în tubul capilar se încălzește automat într-un cilindru metalic. Printr-un orificiu practicat în acest cilindru se trimite un fascicul de lumină prin substanța de testat către o celulă fotoelectrică etalonată cu precizie. În momentul topirii, proprietățile optice ale majorității substanțelor se modifică, în sensul că din opace devin transparente. Astfel, intensitatea luminii care atinge celula fotoelectrică crește și trimite un semnal de oprire indicatorului digital care înregistrează temperatura termometrului cu rezistență de platină plasat în incinta de încălzire. Această metodă nu se poate aplica anumitor substanțe puternic colorate.

**1.4.2. Metode cu suprafață încălzită****1.4.2.1. *Metoda bancului de încălzire Kofler***

Bancul de încălzire Kofler este compus din două piese cu conductivitate termică diferită care se încălzesc electric. Bancul este construit astfel încât gradientul de temperatură să fie aproape linear pe toată lungimea. Temperatura acestui banc de încălzire poate fi determinată de la 283 la 573 K datorită unui dispozitiv de citire a temperaturii format dintr-un cursor cu ac indicator și o riglă gradată concepute special pentru bancul în cauză. Pentru a determina un punct de topire, este suficientă depunerea unui strat fin de substanță direct pe suprafața bancului. În câțva secunde se formează o linie fină de diviziune între faza fluidă și faza solidă. Temperatura la linia de diviziune se citește plasând acul indicator în dreptul acesteia.

**▼B****1.4.2.2.   *Microscop pentru determinarea punctului de topire***

Pentru determinarea punctelor de topire cu cantități foarte mici de substanță se folosesc câteva tipuri de microscopie optice cu încălzire. Temperatura se măsoară în general cu ajutorul unui termocuplu sensibil, dar și cu ajutorul unui termometru cu mercur. Dispozitivul tip pentru determinarea punctului de topire prin microscopie optică la cald este format dintr-o incintă cu încălzire, care conține o placă de metal deasupra căreia se pune eșantionul, deja așezat pe o lamă transparentă. În centrul plăcii metalice există un orificiu care permite trecerea luminii provenite din oglinda de iluminare a microscopului. În timpul utilizării, incinta se închide cu ajutorul unei plăci de sticlă pentru a împiedica circulația aerului în câmpul de lucru.

Încălzirea eșantionului se reglează cu ajutorul unui reostat. Pentru măsurători foarte precise la substanțele anizotrope optice se poate folosi lumina polarizată.

**1.4.2.3.   *Metoda meniscului***

Această metodă se aplică în special poliamidelor.

Se determină temperatura la care se observă cu ochiul liber deplasarea unui menisc de ulei de silicon, prins între o suprafață caldă și o lamelă plasată peste eșantionul de poliamidă de testat.

**1.4.3.    **Metoda de determinare a punctului de congelare****

Se introduce eșantionul într-o eprubetă specială și se așează într-un aparat care permite determinarea punctului de congelare. Se agită ușor eprubeta pe parcursul răcirii, iar temperatura este măsurată la intervale adecvate. Din momentul în care temperatura rămâne constantă la câteva citiri, valoarea acesteia este considerată punct de congelare (după corecția termometrică).

Trebuie evitată răcirea forțată prin menținerea echilibrului între faza solidă și cea lichidă.

**1.4.4.    **Analiza termică******1.4.4.1.   *Analiza termică diferențială (DTA)***

Această tehnică înregistrează diferența de temperatură dintre eșantion și un material de referință, în funcție de temperatură, atunci când substanța și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim termic controlat. Atunci când eșantionul suferă o transformare ce presupune o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (topire) sau exotermă (congelare) de linia de referință a temperaturii.

**▼B****1.4.4.2. Calorimetrie diferențială (DSC)**

Această tehnică înregistrează diferența dintre cantitățile de energie absorbite de eșantion și un material de referință în funcție de timp, atunci când eșantionul și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim de temperatură controlată. Această energie reprezintă energia necesară pentru ca diferența de temperatură dintre substanță și materialul de referință să devină nulă. Atunci când eșantionul suferă o transformare care implică o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (topire) sau exotermă (congelare) de la linia de referință a fluxului termic.

**1.4.5. Punctul de curgere**

Această metodă a fost elaborată pentru a fi folosită în cazul uleiurilor din petrol și se utilizează în cazul substanțelor uleioase cu temperaturi de topire scăzute.

După o încălzire preliminară, eșantionul se răcește cu o viteză specifică și se examinează din punctul de vedere al caracteristicilor de curgere la intervale de 3 K. Cea mai scăzută temperatură la care se mai observă o deplasare a substanței se înregistrează ca punct de curgere.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Aplicabilitatea și acuratețea diferitelor metode folosite pentru determinarea punctului de topire/intervalului de topire sunt prezentate în următorul tabel:

TABEL: APLICABILITATEA METODELOR

**A. Metode capilare**

| Metodă de măsurare                    | Substanțe ușor pulverizabile | Substanțe greu pulverizabile         | Interval de temperatură | Acuratețea estimării <sup>(1)</sup> | Standarde existente |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Dispozitiv prevăzut cu baie de lichid | Da                           | Numai câteva                         | 273 la 573 K            | ± 0,3 K                             | JIS K 0064          |
| Dispozitiv prevăzut cu bloc metalic   | Da                           | Numai câteva                         | 293 la > 573 K          | ± 0,5 K                             | ISO 1218 (E)        |
| Detecție fotoelectrică                | Da                           | Mai multe cu dispozitive de aplicare | 253 la 573 K            | ± 0,5 K                             |                     |

<sup>(1)</sup> În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate a substanței.

## ▼B

## B. Metoda cu suprafață încălzită și metoda punctului de congelare

| Metodă de măsurare                                | Substanțe ușor pulverizabile | Substanțe greu pulverizabile | Interval de temperatură | Acuratețea estimării <sup>(1)</sup> | Standarde existente |
|---|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Banc de încălzire Kofler                          | Da                           | N u                          | 283 la > 573 K          | ± 1 K                               | ANSI/ASTM D 3451-76 |
| Microscop pentru determinarea punctului de topire | Da                           | Numai la câteva              | 273 la > 573 K          | ± 0,5 K                             | DIN 53736           |
| Metoda meniscului                                 | Nu                           | Special pentru poliamide     | 293 la > 573 K          | ± 0,5 K                             | ISO 1218 (E)        |
| Metode de determinare a punctului de congelare    | Da                           | Da                           | 223 la 573 K            | ± 0,5 K                             | ex. BS 4695         |

<sup>(1)</sup> În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

## C. Metode de analiză termică

| Metodă de măsurare           | Substanțe ușor pulverizabile | Substanțe greu pulverizabile | Interval de temperatură | Acuratețea estimării <sup>(1)</sup>           | Standarde existente |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|---|---------------------|
| Analiza termică diferențială | Da                           | Da                           | 173 la 1 273 K          | până la 600 K ± 0,5 K până la 1 273 K ± 2,0 K | ASTM E 537-76       |
| Calorimetrie diferențială    | Da                           | Da                           | 173 la 1 273 K          | până la 600 K ± 0,5 K până la 1 273 K ± 2,0 K | ASTM E 537-76       |

<sup>(1)</sup> În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

## D. Punct de curgere

| Metodă de măsurare | Substanțe ușor pulverizabile                    | Substanțe greu pulverizabile                    | Interval de temperatură | Acuratețea estimării <sup>(1)</sup> | Standarde existente |
|--------------------|---|---|-------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Punct de curgere   | Pentru uleiuri petroliere și substanțe uleioase | Pentru uleiuri petroliere și substanțe uleioase | 223 la 323 K            | ± 0,3 K                             | ASTM D 97-66        |

<sup>(1)</sup> În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

## 1.6. DESCRIEREA METODELOR

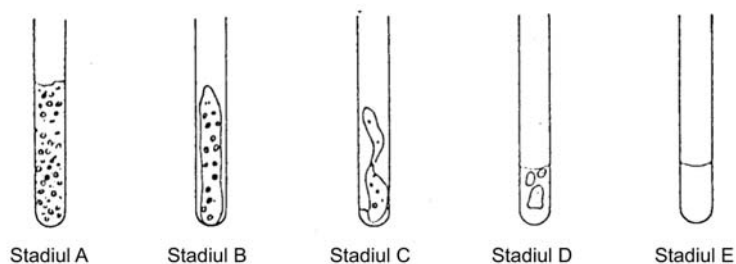
Modurile de operare corespunzătoare aproape tuturor metodelor de testare au fost descrise în standardele internaționale și naționale (a se vedea apendicele).

## 1.6.1. Metode cu tub capilar

Atunci când sunt supuse unei creșteri de temperatură, substanțele fin pulverizate prezintă de regulă stadiile de topire prezentate în figura 1.

▼ B

Figura 1



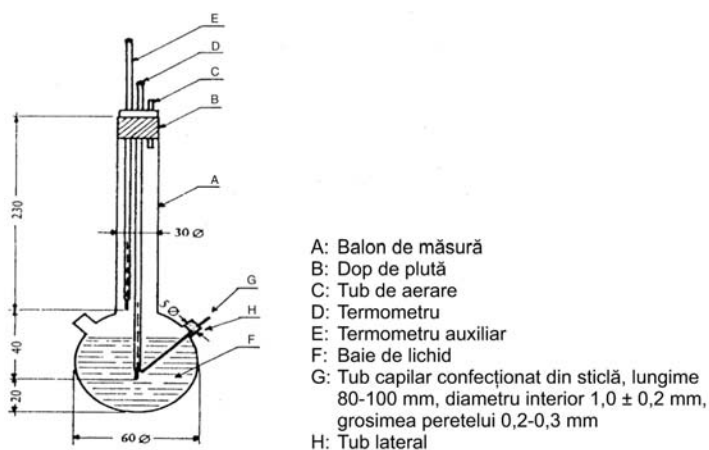
- Stadiul A (începutul topirii): punct umed: se formează picături fine pe peretele interior al tubului capilar.
- Stadiul B apare un spațiu liber între eșantion și peretele interior al tubului datorită retracției produsului în faza de topire.
- Stadiul C eșantionul retractat începe să se scufunde și să se lichefieză.
- Stadiul D se formează un menisc complet la suprafață dar o cantitate considerabilă din eșantion rămâne în fază solidă.
- Stadiul E (stadiul final al topirii): nu mai există particule solide.

În timpul determinării punctului de topire se înregistrează temperaturile corespunzătoare primului și ultimului stadiu al procesului.

#### 1.6.1.1. Instalație pentru determinarea punctului de topire cu baie de lichid

Figura 2 descrie un tip de aparat standardizat, confecționat din sticlă (JIS K 0064). Toate specificațiile sunt exprimate în milimetri.

Figura 2



**▼B***Baia de lichid:*

Lichidul care se folosește se alege în funcție de punctul de topire care urmează să fie determinat, de exemplu parafină lichidă pentru punctele de topire care nu depășesc 473 K, ulei de silicon pentru punctele de topire care nu depășesc 573 K.

Se poate folosi un amestec din trei părți de acid sulfuric și două părți de sulfat de potasiu (în proporție masică) pentru punctele de topire care depășesc 523 K. În cazul utilizării unui astfel de amestec, se vor lua măsurile de precauție corespunzătoare.

*Termometrul:*

Pot fi folosite numai acele termometre care îndeplinesc cerințele următoarelor standarde sau ale standardelor echivalente:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Mod de operare:*

Substanța uscată se pulverizează fin într-un mojar și se introduce într-un tub capilar, închis la un capăt, astfel încât înălțimea de umplere să fie de aproximativ 3 mm după ce substanța a fost compactată. Pentru a obține un eșantion uniform compactat, tubul capilar trebuie să fie lăsat să cadă de la o înălțime de aproximativ 700 mm, printr-un tub de sticlă vertical pe o sticlă de ceas.

Tubul capilar plin este plasat în baie astfel încât partea centrală a rezervorului de mercur al termometrului să fie în contact cu partea tubului capilar care este amplasat eșantionul. De obicei, tubul capilar se introduce în baie la aproximativ 10 K sub punctul de topire.

Lichidul băii se încălzește astfel încât creșterea temperaturii să fie de 3 K/min. Lichidul trebuie agitat. La aproximativ 10 K sub temperatura presupusă de topire, viteza de creștere a temperaturii se stabilește la maximum 1 K pe minut.

*Calcul:*

Calculul punctului de topire este redat mai jos:

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

unde:

$T$  = temperatura de topire corectată, exprimată în K

$T_D$  = temperatura citită la termometrul D, exprimată în K

$T_E$  = temperatura citită la termometrul E, exprimată în K

$n$  = numărul de gradații ale coloanei de mercur citite pe tija termometrului D, aflate deasupra lichidului.

1.6.1.2. *Dispozitive cu bloc metalic pentru măsurarea punctului de topire**Aparatură:**Aparatul cuprinde:*

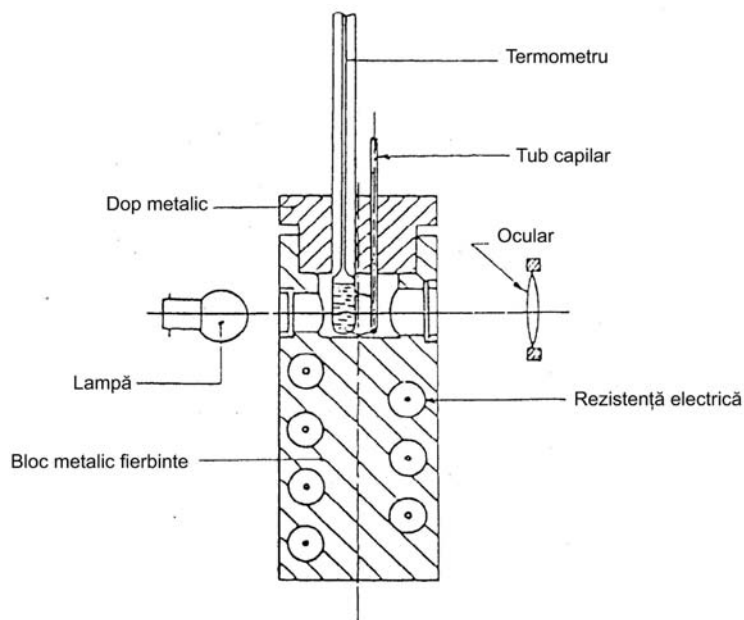
- un bloc metalic cilindric, a cărui parte superioară este scobită și formează o incintă de încălzire (a se vedea figura 3);
- un dop metalic prevăzut cu două sau mai multe orificii care permit introducerea tuburilor în bloc;

▼ B

- un sistem de încălzire a blocului metalic care poate fi format dintr-o rezistență electrică în bloc;
- un reostat pentru reglarea puterii, în cazul unei încălziri electrice;
- patru ferestre din sticlă termorezistentă, pe pereții laterali ai incintei, dispuse simetric în unghi drept. În fața uneia din ferestre se montează un ocular pentru observarea tubului capilar. Celelalte trei ferestre permit iluminarea interiorului incintei cu ajutorul unor lămpi;
- un tub capilar din sticlă termorezistentă închis la un capăt (a se vedea punctul 1.6.1.1).

A se vedea standardele menționate la punctul 1.6.1.1. Se pot folosi, de asemenea, elemente termoelectrice de precizie echivalentă.

Figura 3



#### 1.6.1.3. Detecție fotoelectrică

##### *Aparatură și mod de operare:*

Aparatul este format dintr-o incintă metalică prevăzută cu un sistem de încălzire automatizat. Se umple trei tuburi capilare după cum s-a indicat la punctul 1.6.1.1 și se pun în cuptor.



**▼B**

Pentru calibrarea aparatului se folosesc mai multe creșteri liniare de temperatură, iar creșterea de temperatură convenabilă este reglată electric la o viteză constantă și liniară, preselectată. Înregistratoarele indică temperatura reală a cuptorului și temperatura substanței în tuburile capilare.

1.6.2. **Metodele suprafeței încălzite**

1.6.2.1. *Bancul de încălzire Kofler*

A se vedea apendicele.

1.6.2.2. *Microscopul pentru determinarea punctului de topire*

A se vedea apendicele.

1.6.2.3. *Metoda meniscului (poliamide)*

A se vedea apendicele.

În jurul punctului de topire, creșterea temperaturii trebuie să fie mai mică de 1 K pe minut.

1.6.3. **Metode pentru determinarea punctului de congelare**

A se vedea apendicele.

1.6.4. **Analiza termică**

1.6.4.1. *Analiza termică diferențială*

A se vedea apendicele.

1.6.4.2. *Calorimetria diferențială*

A se vedea apendicele.

1.6.5. **Determinarea punctului de curgere**

A se vedea apendicele.

2. **DATE**

În unele cazuri se impune corecția termometrică.

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— metoda folosită;

— specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există;

— estimare acurateții metodei.

Punctul de topire indicat în raport este media a cel puțin două măsurători care se găsesc în intervalul de precizie estimat (a se vedea tabelele).

**▼B**

Dacă diferența dintre temperatura din stadiul inițial și cea din stadiul final al topirii se află în limitele de precizie a metodei, temperatura de topire în stadiul final este considerată ca punct de topire; în caz contrar, se indică în raport cele două temperaturi.

Dacă substanța se descompune sau sublimează înainte de a atinge punctul de topire, se indică în raport temperatura la care s-a observat efectul.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impuritățile și starea fizică a substanței.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline. 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, p. 803-834.
3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ, New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 505-515.

**▼B***Apendice*

*Pentru mai multe detalii tehnice, pot fi consultate următoarele standarde.*

**1. Metodele tubului capilar**

**1.1. Dispozitive pentru măsurarea punctului de topire cu baie de lichid**

|               |   |
|---------------|---|
| ASTM E 324-69 | Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals |
|---------------|---|

|         |  |
|---------|--|
| BS 4634 | Method for the determination of melting point and/or melting range |
|---------|--|

|           |   |
|-----------|---|
| DIN 53181 | Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren |
|-----------|---|

|             |  |
|-------------|--|
| JIS K 00-64 | Testing methods for melting point of chemical products |
|-------------|--|

**1.2. Dispozitive pentru determinarea punctului de topire cu bloc metalic fierbinte**

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

|              |  |
|--------------|--|
| ISO 1218 (E) | Plastics – polyamides – determination of „melting point” |
|--------------|--|

**2. Metodele suprafeței calde**

**2.1. Banc de încălzire Kofler**

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

**2.2. Microscop pentru determinarea punctului de topire**

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

**2.3. Metoda meniscului (poliamide)**

|              |  |
|--------------|--|
| ISO 1218 (E) | Plastics – polyamides – determination of „melting point” |
|--------------|--|

**▼B**

ANSI/ASTM D 2133-66      Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

NF T 51-050      Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion” méthode du menisque

3.      **Metode pentru determinarea punctului de congelare**

BS 4633      Method for the determination of crystallising point

BS 4695      Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)

DIN 51421      Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207      Cires de pétrole: détermination de la température de figeage

DIN 53175      Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren

NF T 60-114      Point de fusion des paraffines

NF T 20-051      Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)

ISO 1392      Method for the determination of the freezing point

4.      **Analiza termică**

4.1.      **Analiza termică diferențială**

ASTM E 537-76      Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85      Standard definitions of terms relating to thermal analysis

**▼B**

|      |  |  |
|------|--|--|
|      | ASTM E 472-86                            | Standard practice for reporting thermoanalytical data  |
|      | DIN 51005                                | Thermische Analyse, Begriffe   |
| 4.2. | Calorimetrie diferențială                |  |
|      | ASTM E 537-76                            | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis   |
|      | ASTM E 473-85                            | Standard definitions of terms relating to thermal analysis   |
|      | ASTM E 472-86                            | Standard practice for reporting thermoanalytical data  |
|      | DIN 51005                                | Thermische Analyse, Begriffe   |
| 5.   | <b>Determinarea punctului de curgere</b> |  |
|      | NBN 52014                                | Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt |
|      | ASTM D 97-66                             | Standard test method for pour point of petroleum oils  |
|      | ISO 3016                                 | Petroleum oils – Determination of pour point   |

**▼B****A.2. PUNCTUL DE FIERBERE****1. METODĂ**

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt prezentate în referințele bibliografice 2 și 3.

**1.1. INTRODUCERE**

Metodele și aparatele descrise în continuare pot fi aplicate substanțelor lichide și celor cu punct de topire scăzut, care nu intră în reacție chimică sub punctul de fierbere (de exemplu, auto-oxidare, izomerizări, degradare etc.). Metodele se aplică substanțelor lichide pure și impure.

Se acordă atenție descrierii metodelor care folosesc detecția fotoelectrică și analiza termică deoarece acestea permit determinarea nu numai a punctului de fierbere, ci și a punctului de topire. În plus, măsurările se pot efectua în mod automat.

„Metoda dinamică” are avantajul că poate fi folosită și pentru determinarea presiunii vaporilor, iar aducerea temperaturii de fierbere la condiții normale de presiune (101,325 kPa) nu este necesară, deoarece se poate menține presiunea normală pe parcursul măsurării, folosind un manometru de contact.

*Observații:*

Influența impurităților asupra determinării punctului de fierbere depinde în mare măsură de natura impurităților. Atunci când există în eșantion impurități volatile care ar putea afecta rezultatele, substanța se purifică.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Punctul de fierbere normal se definește ca temperatura la care presiunea de vaporii a lichidului este 101,325 kPa.

Dacă punctul de fierbere nu se măsoară la presiune atmosferică normală, relația între temperatură și presiunea de vaporii este dată de ecuația Clausius-Clapeyron:

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

unde:

$P$  = presiunea de vaporii a substanței, exprimată în pascali

$\Delta H_v$  = căldura sa de vaporizare, exprimată în J mol<sup>-1</sup>

$R$  = constanta universală a gazelor = 8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>

$T$  = temperatura termodinamică, exprimată în K

Indicarea punctului de fierbere este însoțită de precizarea presiunii ambiante în timpul măsurătorii.

**▼B***Formule de conversie*

Presiunea (unități: kPa)

$$100 \text{ kPa} = 1 \text{ bar} = 0,1 \text{ MPa}$$

(folosirea „barului” este încă permisă, dar nu este recomandată)

$$133 \text{ Pa} = 1 \text{ mm Hg} = 1 \text{ Torr}$$

(unitățile „mm Hg” și „Torr” nu sunt permise).

$$1 \text{ atm} = \text{atmosferă standard} = 101\,325 \text{ Pa}$$

(unitatea „atm” nu este permisă).

Temperatura (unități: K)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatura Celsius, exprimată în grade Celsius (°C)

T: temperatura termodinamică, exprimată în grade Kelvin (K)

### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Anumite substanțe de etalonare sunt menționate în metodele enumerate în apendice.

### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Cinci metode pentru determinarea punctului de fierbere (a intervalului de fierbere) se bazează pe măsurătoarea temperaturii de fierbere, alte două se bazează pe analiza termică.

#### 1.4.1. Determinarea prin folosirea ebulliometrului

Ebulliometrele au fost create inițial pentru determinarea masei moleculare prin creșterea punctului de fierbere, dar sunt adecvate și pentru măsurarea exactă a punctului de fierbere. Un aparat foarte simplu este descris în standardul ASTM D 1120-72 (a se vedea apendicele). Lichidul se încălzește în acest aparat în condiții de echilibru la presiune atmosferică, până la fierbere.

#### 1.4.2. Metoda dinamică

Această metodă prevede măsurarea temperaturii de recondensare a vaporilor cu ajutorul unui termocuplu montat în reflux în timpul fierberii. În această metodă se poate modifica presiunea.

#### 1.4.3. Metoda distilării pentru punctul de fierbere

Această metodă prevede distilarea lichidului, măsurarea temperaturii de recondensare a vaporilor și determinarea cantității de distilat.

**▼B****1.4.4. Metoda Siwoloboff**

Se încălzește un eșantion într-o eprubetă care este imersată într-o baie cu lichid încălzit. Se scufundă în eprubetă un capilar închis, care conține o bulă de aer în partea inferioară.

**1.4.5. Detecția fotoelectrică**

Conform principiului Siwoloboff, măsurarea fotoelectrică automată se face folosind ascensiunea bulelor.

**1.4.6. Analiza termică diferențială**

Această tehnică înregistrează diferența de temperatură dintre substanță și un material de referință în funcție de temperatură în timp pe substanța și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim termic controlat. Atunci când eșantionul trece printr-o stare de tranziție ce presupune o variație de entalpie, această modificare este indicată prin endotermică (fierbere) de la linia de referință a temperaturii.

**1.4.7. Calorimetria diferențială**

Această tehnică înregistrează diferența dintre cantitățile de energie absorbite de o substanță și un material de referință în funcție de timp, atunci când eșantionul și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim de temperatură controlată. Această energie reprezintă energia necesară pentru ca diferența de temperatură dintre substanță și materialul de referință să devină nulă. Atunci când eșantionul suferă o transformare care implică o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (fierbere) de la linia de referință a fluxului termic.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Aplicabilitatea și precizia diferitelor metode folosite la determinarea temperaturii/intervalului de fierbere sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

**Compararea metodelor**

| Metodă de măsurare                      | Precizie estimată  | Standard existent                |
|---|--|----------------------------------|
| Ebuliometru                             | ± 1,4 K (până la 373 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup><br>± 2,5 K (până la 600 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> | ASTM D 1120-72 <sup>(1)</sup>    |
| Metoda dinamică                         | ± 0,5 K (până la 600 K) <sup>(2)</sup>   |                                  |
| Metoda distilării (domeniu de fierbere) | ± 0,5 K (până la 600 K)  | ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71 |
| Conform cu Siwoloboff                   | ± 2 K (până la 600 K) <sup>(2)</sup>   |                                  |
| Detecție fotoelectrică                  | ± 0,3 K (până la 373 K) <sup>(2)</sup>   |                                  |
| Calorimetrie termică diferențială       | ± 0,5 K (până la 600 K)<br>± 2,0 K (până la 1 273 K)   | ASTM E 537-76                    |
| Calorimetrie diferențială               | ± 0,5 K (până la 600 K)<br>± 2,0 K (până la 1 273 K)   | ASTM E 537-76                    |

<sup>(1)</sup> Această precizie este valabilă numai pentru dispozitive simple cum ar fi cel descris în ASTM D 1120-72; aceasta poate fi îmbunătățită cu ebuliometre mult mai sofisticate.

<sup>(2)</sup> Valabil numai pentru substanțe pure. Folosirea în alte circumstanțe trebuie să fie justificată.



**▼B****1.6. DESCRIEREA METODELOR**

Modurile de operare în unele metode de testare sunt descrise în standardele naționale și internaționale (a se vedea apendicele).

**1.6.1. Ebulliometru**

A se vedea apendicele.

**1.6.2. Metoda dinamică**

A se vedea metoda de analiză A.4 pentru determinarea presiunii de vapori.

Se înregistrează temperatura de fierbere observată la o presiune aplicată de 101,325 kPa.

**1.6.3. Metoda distilării (intervalul de fierbere)**

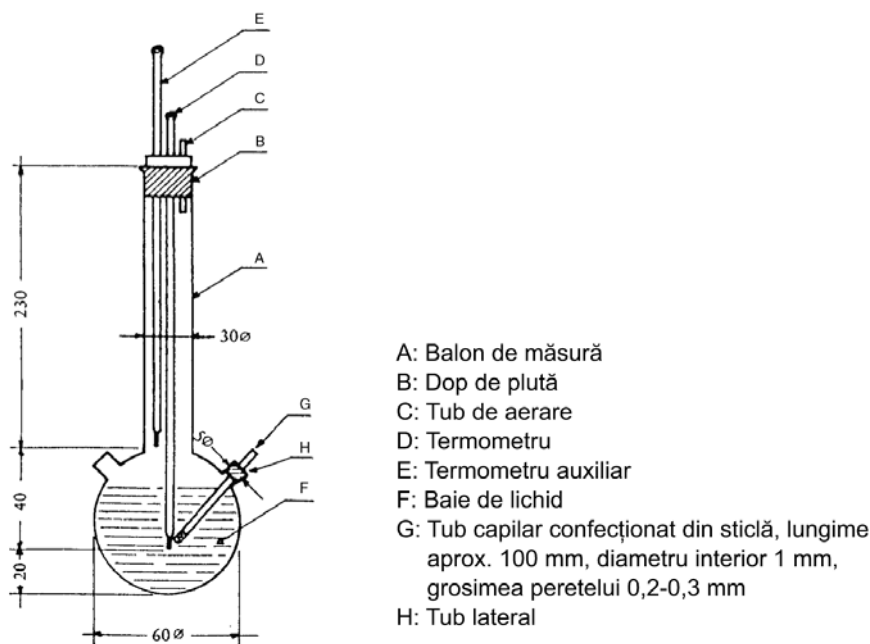
A se vedea apendicele.

**1.6.4. Metoda Siwoloboff**

Se introduce eșantionul într-o eprubetă cu un diametru de cca. 5 milimetri și se încălzește într-un aparat care servește la determinarea punctului de topire (figura 1).

Figura 1 prezintă schema unui aparat standardizat de măsurare a punctului de topire și fierbere (JIS K 0064) (confectionat din sticlă, toate specificațiile sunt în milimetri).

Figura 1



Se scufundă un tub capilar (capilar de fierbere), închis la cca. 1 centimetru deasupra extremității inferioare, în eprubeta cu substanța de testat. Nivelul până la care se adaugă substanța de testat este astfel încât partea etanșată a capilarului să fie sub nivelul suprafeței lichidului. Eprubeta se atașează la termometru cu o bandă de cauciuc sau se fixează cu un suport de partea laterală (a se vedea figura 2).



Figura 2

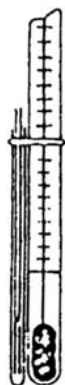
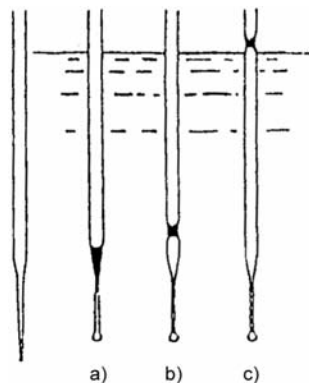
**Metoda Siwoloboff**

Figura 3

**Metoda modificată**

Lichidul din baie se alege în funcție de punctul de fierbere. La temperaturi de până la 573 K se folosește uleiul de silicon. Parafina lichidă se poate folosi numai până la 473 K. Încălzirea băii de lichid se reglează pentru început la o creștere de temperatură de 3 K/min. Lichidul din baie trebuie agitat. La aproximativ 10 K sub punctul de fierbere presupus, încălzirea se reduce astfel încât viteza de creștere a temperaturii să fie mai mică de 1 K/min. Atunci când se apropie de punctul de fierbere, bulele încep să se ridice rapid din capilar.

Punctul de fierbere este acea temperatură la care, în cazul unei răciri momentane, șiragul de bule se întrerupe, iar fluidul începe brusc să se ridice în capilar. Temperatura citită în acel moment pe termometru indică punctul de fierbere a substanței.

În metoda modificată (a se vedea figura 3), punctul de fierbere se determină într-un tub capilar de măsurat la punctul de topire. Extremitatea inferioară a acestuia se prelungește cu un vârf cu o lungime de aproximativ 2 cm (a) în interiorul căruia se aspiră o cantitate mică de substanță de testat. Se etanșează vârful prin încălzire, captându-se o bulă mică de aer în interior. În timpul încălzirii, în aparatul de măsurat punctul de topire (b), bula de aer se dilată. Punctul de fierbere corespunde temperaturii la care eșantionul de substanță atinge nivelul suprafeței lichidului din baie (c).

**1.6.5. Detectia fotoelectrică**

Se încălzește un eșantion din substanța de testat într-un tub capilar așezat în interiorul unui bloc metalic de încălzire.

Prin orificiile practicate în bloc, un fascicol de lumină este trimis prin substanță către o celulă fotoelectrică calibrată cu precizie.

În timp ce crește temperatura eșantionului, bule de aer individuale încep să se ridice din tubul capilar. Când punctul de fierbere este atins, numărul de bule crește substanțial. Modificarea intensității luminoase care urmează este înregistrată de către celulă, care trimite un semnal de oprire indicatorului de temperatură, respectiv un termometru cu rezistență de platină plasat în interiorul blocului.

Această metodă este deosebit de utilă deoarece permite efectuarea unor determinări sub nivelul temperaturii ambiante până la 253,15 K (– 20 °C), fără nicio modificare a aparatului. Este necesar doar ca aparatul să fie așezat într-o baie de răcire.

**▼B****1.6.6. Analize termice****1.6.6.1. Analiza termică diferențială**

A se vedea apendicele.

**1.6.6.2. Calorimetria diferențială**

A se vedea apendicele.

**2. DATE**

Pentru diferențe mici față de presiunea normală (maximum  $\pm 5$  kPa) punctul de fierbere se poate corecta ( $T_n$ ) cu ajutorul ecuației Sidney-Young:

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

unde:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ (atenție la semn)}$$

$p$  = presiunea măsurată, în kPa

$f_T$  = viteza de variație a punctului de fierbere cu presiunea, în K/kPa

$T$  = temperatura de fierbere măsurată, în K

$T_n$  = temperatura de fierbere corectată la presiunea normală, în K

Pentru numeroase substanțe, factorii de corecție a temperaturii  $f_T$  și ecuațiile pentru aproximarea acestora figurează în standardele naționale și internaționale mai sus menționate.

De exemplu, metoda DIN 53171 menționează următoarele corecții aproximative pentru solvenți conținuți în vopsele.

*Tabelul 2*

**Temperatura – factori de corecție  $f_T$**

| Temperatura T (K) | Factori de corecție $f_T$ (K/kPa) |
|-------------------|-----------------------------------|
| 323,15            | 0,26                              |
| 348,15            | 0,28                              |
| 373,15            | 0,31                              |
| 398,15            | 0,33                              |
| 423,15            | 0,35                              |
| 448,15            | 0,37                              |
| 473,15            | 0,39                              |
| 498,15            | 0,41                              |
| 523,15            | 0,44                              |
| 548,15            | 0,45                              |
| 573,15            | 0,47                              |

**▼B****3. RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

- metoda folosită;
- specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există;
- estimarea acurateții metodei.

Punctul de fierbere indicat în raport este media a cel puțin două măsurători care se găsesc în intervalul de precizie estimat (a se vedea tabelul 1).

Se prezintă punctele de fierbere măsurate și media lor, iar presiunea (presiunile) la care s-au făcut măsurătorile se exprimă în kPa. Este preferabil ca presiunea să fie apropiată de presiunea atmosferică normală.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impurități și la starea fizică a substanței.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.
3. R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

**▼B***Apendice*

*Pentru mai multe date tehnice, pot fi consultate standardele următoare, de exemplu.*

1. **Ebuliometru**

1.1. Dispozitive cu baie de lichid

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

2. **Metoda distilării (a intervalului de fierbere)**

|           |  |
|-----------|--|
| ISO/R 918 | Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range) |
|-----------|--|

|            |  |
|------------|--|
| BS 4349/68 | Method for determination of distillation of petroleum products |
|------------|--|

|            |  |
|------------|--|
| BS 4591/71 | Method for the determination of distillation characteristics |
|------------|--|

|           |   |
|-----------|---|
| DIN 53171 | Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes |
|-----------|---|

|             |   |
|-------------|---|
| NF T 20-608 | Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation |
|-------------|---|

3. **Analiza termică diferențială și calorimetria diferențială**

|               |  |
|---------------|--|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
|---------------|--|

|               |  |
|---------------|--|
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
|---------------|--|

|               |   |
|---------------|---|
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
|---------------|---|

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |
|-----------|------------------------------|

**▼B****A.3. DENSITATEA RELATIVĂ****1. METODĂ**

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt menționate în referința bibliografică 2.

**1.1. INTRODUCERE**

Metodele descrise pentru determinarea densității relative sunt aplicabile substanțelor solide și lichide, fără nicio restricție cu privire la gradul de puritate. Diferitele metode care pot fi folosite sunt prezentate în tabelul 1.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Densitatea relativă  $D_{20}^{20}$  a solidelor sau lichidelor reprezintă raportul dintre masa unui volum de substanță, determinată la 20 °C, și masa aceluiasi volum de apă, determinată la 4 °C. Densitatea relativă este un număr adimensional.

Densitatea  $\rho$  a unei substanțe este raportul dintre masa acesteia  $m$  și volumul său  $v$ .

Densitatea  $\rho$  este exprimată în unități SI în  $\text{kg/m}^3$ .

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ (1) (3)**

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință de fiecare dată când se studiază o substanță nouă. Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateții metodei și să permită comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

**1.4. PRINCIPIUL METODELOR**

Se folosesc 4 clase de metode.

**1.4.1. Metode prin flotabilitate****1.4.1.1. Hidrometrul (pentru substanțe lichide)**

Se pot obține determinări ale densității suficient de precise și de rapide cu ajutorul unor hidrometre plutitoare care permit deducerea densității unui lichid din adâncimea de imersiune indicată pe o scară gradată.

**1.4.1.2. Balanța hidrostatică (pentru substanțe lichide și solide)**

Diferența dintre masa unui eșantion măsurate în aer și într-un lichid corespunzător (de exemplu apa) poate fi folosită pentru a determina densitatea acestuia.

În cazul solidelor, densitatea măsurată nu este reprezentativă decât în cazul acelui eșantion. Pentru a determina densitatea unui lichid se cântărește un corp cu volum  $V$  cunoscut, întâi în aer, apoi în lichid.

**1.4.1.3. Metoda corpului scufundat (pentru substanțe lichide) (4)**

În această metodă, densitatea unui lichid este determinată ca diferența dintre rezultatele cântăririlor lichidului înainte și după imersia unui corp de volum cunoscut în acest lichid.

**▼B****1.4.2. Metode picnometrice**

În cazul solidelor sau al lichidelor se pot folosi picnometre cu forme diferite, ale căror volume sunt cunoscute. Densitatea se determină pornind de la diferența de greutate între picnometrul plin și picnometrul gol, pe de o parte, și volumul cunoscut al acestuia, pe de altă parte.

**1.4.3. Picnometru de comparație cu aer (pentru solide)**

Densitatea unui solid cu orice formă poate fi măsurată, la temperatura camerei cu ajutorul unui picnometru de comparație cu gaz. Volumul unei substanțe în aer sau în gaz inert se măsoară într-un cilindru gradat, cu volum variabil calibrat. Pentru determinarea densității, după măsurarea volumului se măsoară și masa solidului.

**1.4.4. Densimetru oscilant (5) (6) (7)**

Densitatea unui lichid se poate măsura cu densimetrul oscilant. Un oscilator mecanic în formă de U vibrează cu o frecvență de rezonanță care depinde de masa sa. Introducerea unui eșantion de substanță modifică frecvența de rezonanță a oscilatorului. Acesta trebuie etalonat cu ajutorul a două substanțe ale căror densități se cunosc. Substanțele se aleg astfel încât densitățile acestora să acopere intervalul de măsură.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Aplicabilitatea diferitelor metode folosite pentru determinarea densității relative este prezentată în tabel.

**1.6. DESCRIEREA METODELOR**

Standardele menționate ca exemple, care se pot consulta pentru mai multe detalii tehnice, sunt enumerate în apendice.

Testele se efectuează la o temperatură de 20 °C și trebuie să cuprindă cel puțin două măsurători.

**2. DATE**

A se vedea standardele.

**3. RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— metoda folosită;

— specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există.

Densitatea relativă  $D_4^{20}$  se indică în conformitate cu definiția de la punctul 1.2, împreună cu starea fizică a substanței.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impuritățile și starea fizică a substanței.



Tabel

## Aplicabilitatea metodelor

| Metoda de măsurare                           | Densitate |        | Vâscozitatea dinamică<br>maximă posibilă | Standarde existente                 |
|--|-----------|--------|--|-------------------------------------|
|  | Solid     | Lichid |  |                                     |
| 1.4.1.1. Hidrometru                          |           | Da     | 5 Pa s                                   | ISO 387<br>ISO 649-2<br>NF T 20-050 |
| 1.4.1.2. Balanța<br>hidrostatică             |           |        |  |                                     |
| (a) solide                                   | Da        |        |  | ISO 1183(A)                         |
| (b) lichide                                  |           | Da     | 5 Pa s                                   | ISO 901 și 758                      |
| 1.4.1.3. Metoda pluti-<br>torului            |           | Da     | 20 Pa s                                  | DIN 53217                           |
| 1.4.2. Picnometru                            |           |        |  | ISO 3507                            |
| (a) solide                                   | Da        |        |  | ISO 1183(B)<br>NFT 20-053           |
| (b) lichide                                  |           | Da     | 500 Pa s                                 | ISO 758                             |
| 1.4.3. Picnometru<br>de comparație<br>cu aer | Da        |        |  | DIN 55990 Teil 3<br>DIN 53243       |
| 1.4.4. Densimetru<br>oscilant                |           | Da     | 5 Pa s                                   |                                     |

## 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.
3. IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 508.
4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. II, p. 427-430.
5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, p. 297-302.
6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, p. 717-726.
7. Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253-255.



**▼B***Apendice*

*Pentru mai multe detalii tehnice pot fi consultate următoarele standarde suplimentare.*

1. **Metode prin flotabilitate**

1.1. Hidrometrul

DIN 12790, ISO 387 Hydrometer; general instructions

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

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

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

DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Balanța hidrostatică

*Pentru substanțe solide:*

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

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

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

DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

*Pentru substanțe lichide:*

ISO 901 ISO 758

**▼B**

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

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

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

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

1.3.                      Metoda corpului scufundat

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

2.                      **Metode picnometrice**

2.1.                      Pentru substanțe lichide

ISO 3507                      Pycnometers

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

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

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

DIN 12800                      Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)

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

**▼B**

|             |  |
|-------------|--|
| DIN 12806   | Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen) |
| DIN 12807   | Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)  |
| DIN 12808   | Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)   |
| DIN 12809   | Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)  |
| DIN 53217   | Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer  |
| DIN 51757   | Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density   |
| ASTM D 297  | Section 15: Rubber products – chemical analysis  |
| ASTM D 2111 | Method C: Halogenated organic compounds  |
| BS 4699     | Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)                                 |
| BS 5903     | Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method                              |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method                                     |

**▼B**

## 2.2. Pentru substanțe solide

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

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

DIN 19683                    Determination of the density of soils

3. **Picnometru de comparație cu aer**

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

DIN 53243                    Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

**▼ M1****A.4. PRESIUNEA DE VAPORI****1. METODĂ**

Prezenta metodă este echivalentă cu orientările OECD privind testele nr. 104 (2004).

**1.1. INTRODUCERE**

Versiunea revizuită a metodei A.4(1) include o metodă suplimentară, metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă, proiectată pentru substanțe cu presiuni de evaporare foarte scăzute (până la  $10^{-10}$  Pa). Având în vedere necesitatea stabilirii de proceduri, în special în cazul obținerii presiunii de vapori pentru substanțele cu presiune de vapori scăzută, sunt reevaluate alte proceduri ale acestei metode în ceea ce privește intervalele diferite de aplicabilitate.

La echilibru termodinamic, presiunea de vapori a unei substanțe în stare pură este exclusiv o funcție de temperatură. Principiile fundamentale sunt descrise în literatura de specialitate (2)(3).

Nu există o singură metodă de măsurare aplicabilă întregului interval de presiuni de vapori de la  $< 10^{-10}$  la  $10^5$  Pa. În această metodă sunt incluse opt metode de măsurare a presiunii de vapori, care pot fi aplicate în intervale diferite de presiuni de vapori. Diferitele metode sunt comparate din punctul de vedere al aplicației și intervalului de măsurare în tabelul 1. Metodele pot fi aplicate doar în cazul compușilor care nu se descompun în condițiile testului. În cazurile în care metodele experimentale nu pot fi aplicate din motive de ordin tehnic, presiunea de vapori poate fi estimată, o metodă de estimare recomandată fiind indicată în apendice.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Presiunea de vapori a unei substanțe este definită ca presiunea de saturație la suprafața de contact cu aerul a unei substanțe solide sau lichide.

Unitatea din Sistemul Internațional (SI) pentru presiune care trebuie folosită este pascalul (Pa). Alte unități alternative folosite de-a lungul timpului, împreună cu factorii lor de conversie, sunt:

$$\begin{aligned} 1 \text{ Torr} &= 1 \text{ mm Hg} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa} \\ 1 \text{ atmosferă} &= 1,013 \times 10^5 \text{ Pa} \\ 1 \text{ bar} &= 10^5 \text{ Pa} \end{aligned}$$

Unitatea de măsură din SI pentru temperatură este kelvinul (K). Transformarea gradelor Celsius în kelvini are loc după formula:

$$T = t + 273,15$$

unde T reprezintă temperatura exprimată în kelvin sau temperatura termodinamică, iar t reprezintă temperatura exprimată în grade Celsius.

▼ **M1**

Tabelul 1

| Metodă de măsurare                                       | Substanța    |        | Repetabilitate estimată | Reproductibilitate estimată | Interval recomandat  |
|--|--------------|--------|-------------------------|-----------------------------|--|
|  | solid        | lichid |                         |                             |  |
| Metoda dinamică  | Topire joasă | Da     | Până la 25 %<br>1-5 %   | Până la 25 %<br>1-5 %       | $10^3$ Pa-<br>$2 \times 10^3$ Pa<br>$2 \times 10^3$ Pa-<br>$10^5$ Pa |
| Metoda statică   | Da           | Da     | 5-10 %                  | 5-10 %                      | $10$ Pa- $10^5$ Pa<br>$10^{-2}$ Pa- $10^5$ Pa <sup>(1)</sup>         |
| Metoda izoteniscopului                                   | Da           | Da     | 5-10 %                  | 5-10 %                      | $10^2$ Pa- $10^5$ Pa   |
| Metoda prin efuziune: balanța pentru presiunea de vapori | Da           | Da     | 5-20 %                  | Până la 50 %                | $10^{-3}$ -1 Pa  |
| Metoda prin efuziune: celulă Knudsen                     | Da           | Da     | 10-30 %                 | —                           | $10^{-10}$ -1 Pa   |
| Metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă          | Da           | Da     | 5-30 %                  | Până la 50 %                | $10^{-10}$ -1 Pa   |
| Metoda gazului saturat                                   | Da           | Da     | 10-30 %                 | Până la 50 %                | $10^{-10}$ - $10^3$ Pa   |
| Metoda rotorului   | Da           | Da     | 10-20 %                 | —                           | $10^{-4}$ - 0,5 Pa   |

<sup>(1)</sup> Când se utilizează un manometru cu capacitanță.

## 1.3. PRINCIPIUL DE TESTARE

În general, presiunea de vapori este determinată la diferite temperaturi. Într-un interval limitat de temperaturi, logaritmul presiunii de vapori a unei substanțe pure este o funcție lineară a inversului temperaturii termodinamice, conform ecuației Clapeyron-Clausius simplificate:

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

unde:

p = presiunea de vapori a substanței, exprimată în pascali

$\Delta H_v$  = căldura de vaporizare, exprimată în J mol<sup>-1</sup>

R = constanta universală a gazelor, 8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>

T = temperatura în K

▼ **M1**

## 1.4. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință. Acestea servesc în special la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

## 1.5. DESCRIEREA METODEI

1.5.1. **Metoda dinamică (Metoda lui Cottrell)**1.5.1.1. *Principiu*

Presiunea de vapori este determinată prin măsurarea temperaturii de fierbere a substanței la diferite presiuni între aproximativ  $10^3$  și  $10^5$  Pa. Această metodă este recomandată, de asemenea, pentru determinarea temperaturii de fierbere. Este utilă în acest sens pentru temperaturi până la 600 K. Temperaturile de fierbere ale lichidelor sunt cu aproximativ 0,1 °C mai mari la o adâncime de 3-4 cm decât la suprafață, datorită presiunii hidrostatice a coloanei de lichid. În metoda lui Cottrell (4), termometrul este plasat în vaporii de la suprafața lichidului, iar lichidul în stare de fierbere este pompat constant pe rezervorul termometrului. Rezervorul este acoperit de un strat subțire de lichid aflat în echilibru cu vaporii la presiune atmosferică. Astfel, termometrul indică punctul de fierbere real, fără erori apărute ca urmare a supraîncălzirii sau a presiunii hidrostatice. Pompa utilizată inițial de Cottrell este ilustrată în figura 1. Tubul A conține lichidul de fierbere. Un fir de platină B fixat la baza tubului facilitează fierberea uniformă. Tubul lateral C face legătura cu un condensator, iar mantaua D previne atingerea termometrului E de către condensatul rece. Când lichidul A este la punctul de fierbere, bulele și lichidul prinse în pâlnie se scurg pe rezervorul termometrului prin cele două brațe ale pompei F.

Figura 1

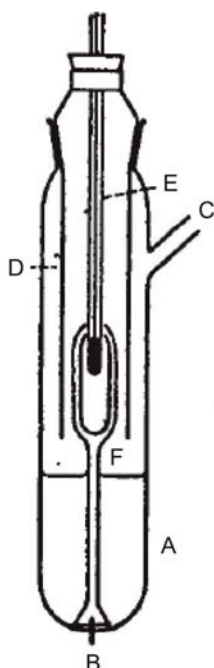
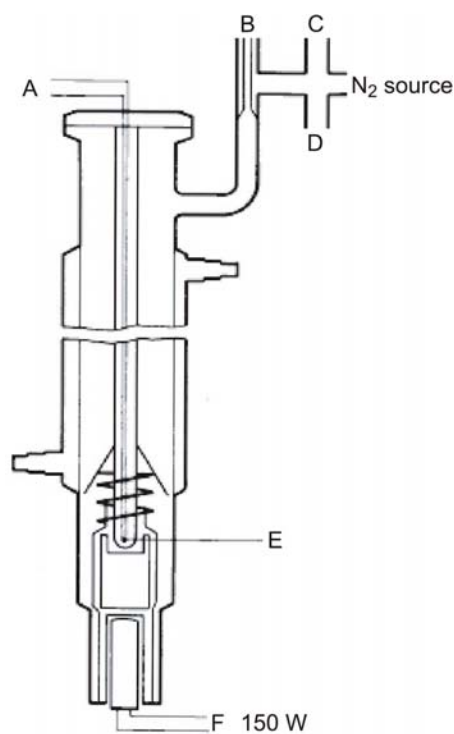


Figura 2



▼ **M1**

Pompă Cottrell (4)

A: Termocuplu

B: Volum tampon

C: Manometru

D: Vid

E: Punct de măsurare

F: Element de încălzire (circa 150 W)

#### 1.5.1.2. *Aparatură*

Un aparat foarte precis, care funcționează conform principiului lui Cottrell, este ilustrat în figura 2. Este format dintr-un tub cu o zonă de fierbere în partea inferioară, un vas de răcire în zona mediană și o ieșire și o flanșă în partea superioară. Pompa Cottrell este plasată în zona de fierbere, încălzită cu ajutorul unui cartuș caloric. Temperatura se măsoară cu ajutorul unui termocuplu izolat sau a unui termometru cu rezistență introduse prin flanșa din vârf. Ieșirea se conectează la sistemul de reglare a presiunii. Acesta din urmă este format dintr-o pompă de vid, un volum tampon, un manostat pentru introducerea de azot necesar reglării presiunii și un manometru.

#### 1.5.1.3. *Procedură*

Substanța se pune în zona de fierbere. Pot să apară probleme în cazul solidelor care nu sunt sub formă de pulbere, dar în unele cazuri acestea se pot rezolva încălzind agentul de răcire din mantaua de răcire. Aparatul se închide la flanșă și substanța se degazează. Această metodă nu poate fi folosită în cazul substanțelor care spumează.

Se stabilește cea mai joasă dintre presiunile dorite și se începe încălzirea. În același timp, senzorul de temperatură se conectează la contor.

Echilibrul este atins atunci când se înregistrează o temperatură de fierbere constantă la presiune constantă. Trebuie evitat fenomenul de vaporizare locală cu fierbere violentă. În plus, în vasul de răcire condensarea trebuie să fie completă. Când se determină presiunea de vapori a solidelor cu punct de topire scăzut, trebuie evitată blocarea condensatorului.

După înregistrarea acestui punct de echilibru se stabilește o presiune mai ridicată. Procesul se continuă în același fel până când se atinge o presiune de  $10^5$  Pa (aproximativ 5-10 măsurători în total). Pentru verificare, aceleași puncte de echilibru trebuie să se regăsească la descrescerea presiunii.

### 1.5.2. **Metoda statică**

#### 1.5.2.1. *Principiu*

În metoda statică (5), presiunea vaporilor la echilibru termodinamic se determină la o temperatură specificată. Metoda este adecvată substanțelor și solidelor și lichidelor care conțin mai multe componente în intervalul  $10^{-1}$ - $10^5$  Pa, și în intervalul 1-10 Pa, cu condiția să fie aplicată atent.



## ▼ M1

## 1.5.2.2. Aparatură

Echipamentul este format dintr-o baie termostatăă (precizie de  $\pm 0,2$  K), un recipient pentru eșantion conectat la o linie de vid, un manometru și un sistem de reglare a presiunii. Vasul eșantion (figura 3a) este conectat la linia de vid prin intermediul unui ventil și al unui manometru diferențial (un tub în formă de U cu un fluid manometric adecvat) utilizat ca indicator de zero. În manometrul diferențial se pot folosi mercur, uleiuri de silicon și ftalați, în funcție de intervalul de presiune și comportamentul chimic al substanței de testat. Totuși, din rațiuni de protecție a mediului, utilizarea mercurului trebuie să fie evitată dacă este posibil. Substanța de testat nu trebuie să se dizolve perceptibil sau să reacționeze cu fluidul din tubul în formă de U. În locul tubului în formă de U se poate folosi un manometru (figura 3b). Pentru manometru, mercurul poate fi utilizat în intervalul de presiune de la normală scăzând până la  $10^2$  Pa, în timp ce uleiurile de silicon și ftalați se folosesc în intervalul de la mai puțin de  $10^2$  Pa până la 10 Pa. Există și alte tipuri de aparate de măsurare a presiunii utilizabile sub  $10^2$  Pa, precum și manometre cu membrană rezistente la temperatură care pot fi folosite chiar sub  $10^{-1}$  Pa. Măsurarea temperaturii se face pe peretele exterior al vasului care conține eșantionul sau chiar în vas.

## 1.5.2.3. Procedură

Utilizând aparatul conform descrierii din figura 3a, se umple vasul în formă de U cu lichidul ales, care trebuie să fie degazat la o temperatură ridicată înainte de a se face citirile. Substanța de testat se introduce în aparat și se degazează la temperatură redusă. În cazul unui eșantion cu mai mulți componenți, temperatura trebuie să fie suficient de scăzută pentru a preveni alterarea compoziției materialului. Echilibrul poate fi stabilit mult mai rapid prin agitare. Eșantionul poate fi răcit cu azot lichid sau gheață carbonică, dar sunt necesare precauții pentru evitarea condensării aerului sau lichidului din pompă. Cu ventilul de deasupra vasului deschis, se evacuează aerul prin aspirație, timp de câteva minute. Dacă este necesar, operația de degazare se repetă de câteva ori.

Figura 3a

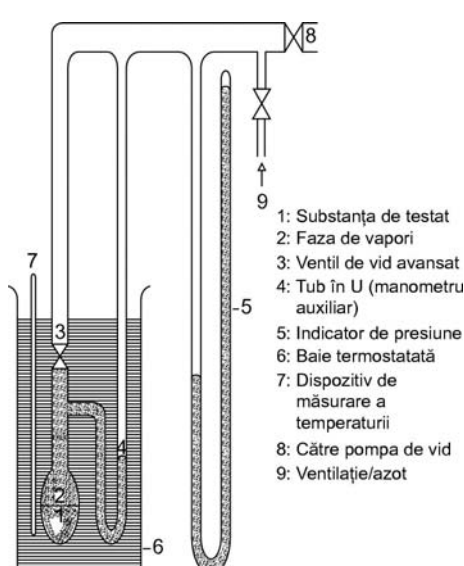
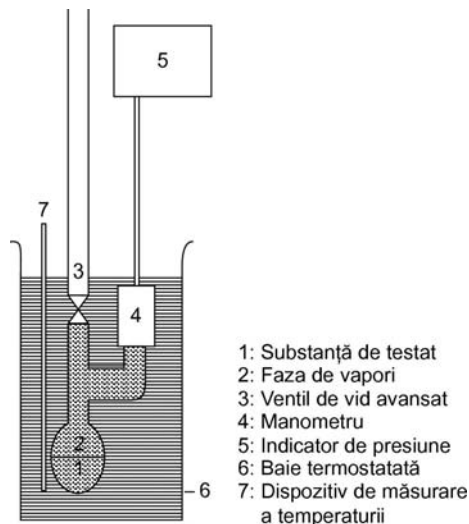


Figura 3b



▼ **M1**

Când eșantionul se încălzește cu ventilul închis, presiunea de vapori crește și modifică echilibrul fluidului din manometrul auxiliar. Pentru compensare se introduce azot sau aer în aparat până când indicatorul de presiune diferențială revine la zero. Presiunea cerută pentru echilibrare trebuie să fie citită la un manometru sau la un instrument de mai mare precizie. Această presiune corespunde presiunii de vapori a substanței la temperatura dată a eșantionului. Dacă se folosește aparatul descris în figura 3b, presiunea de vapori este citită direct.

Valorile presiunii de vapori se determină la intervale de timp mici (aproximativ 5-10 măsurători în total) până la temperatura maximă cerută.

Citirile la temperaturi scăzute trebuie să fie repetate pentru verificare. Dacă valorile obținute la citirile repetate nu coincid cu curba obținută pentru creșterea temperaturii, aceasta se poate datora următoarelor cauze:

- (i) proba conține încă aer (de exemplu, în cazul materialelor cu vâscozitate mare) sau impurități cu temperaturi de fierbere scăzute, care se evaporă în timpul încălzirii;
- (ii) substanța suferă o reacție chimică în intervalul de temperatură analizat (de exemplu descompunere, polimerizare).

### 1.5.3. Metoda izoteniscopului

#### 1.5.3.1. Principiu

Metoda izoteniscopului (6) se bazează pe principiul metodei statice. Metoda presupune introducerea unui eșantion într-un rezervor menținut la temperatură constantă și conectat la un manometru și o pompă de vid. Impuritățile mai volatile decât substanța sunt îndepărtate prin degazare la presiune scăzută. Presiunea de vapori a eșantionului la temperaturi prestabilite este echilibrată cu ajutorul unei presiuni cunoscute a unui gaz inert. Izoteniscopul a fost creat pentru a măsura presiunea de vapori a anumitor hidrocarburi lichide, dar poate fi folosit și pentru studierea materialelor solide. De obicei, această metodă nu este adecvată sistemelor multicomponent. Pentru eșantioane care conțin impurități nevolatile, rezultatele sunt supuse unor marje de eroare destul de scăzute. Intervalul recomandat este  $10^2$ - $10^5$  Pa.

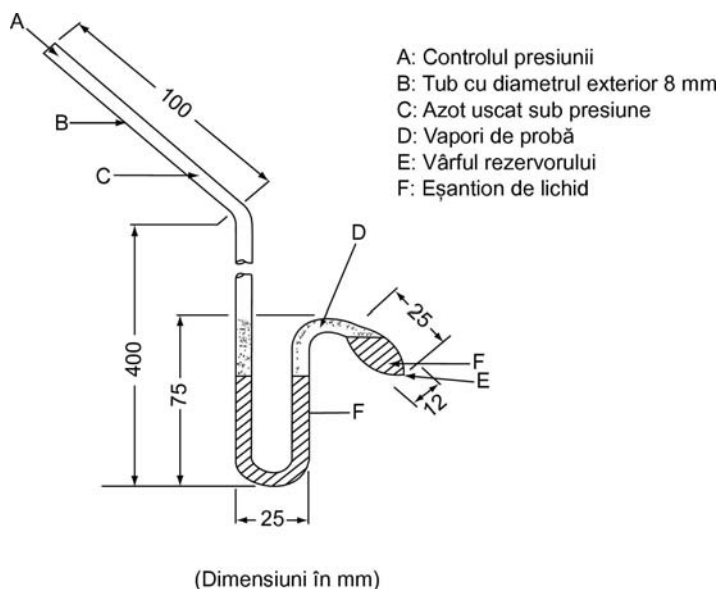
#### 1.5.3.2. Aparatură

Un exemplu de dispozitiv de măsurare este ilustrat în figura 4. O descriere completă poate fi consultată în ASTM D 2879-86 (6).

▼ **M1**1.5.3.3. *Procedură*

În cazul lichidelor, substanța însăși servește ca fluid în manometrul auxiliar. O cantitate de lichid, suficientă pentru a umple rezervorul și brațul scurt al manometrului, se introduce în izoteniscop. Izoteniscopul este atașat la sistemul de vid și golit, după care se umple cu azot. Evacuarea și purjarea sistemului se repetă de două ori pentru îndepărtarea oxigenului rezidual. Izoteniscopul plin este plasat în poziție orizontală, astfel încât proba să se împrăștie într-un strat subțire în rezervorul bulbiform și în manometru. Presiunea sistemului se reduce la 133 Pa și proba se încălzește ușor numai până la fierbere (îndepărtarea gazelor dizolvate). Apoi izoteniscopul este plasat astfel încât proba să se întoarcă în rezervor și în manometru, astfel încât ambele să fie pline cu lichid. Presiunea se menține la 133 Pa. Vârful rezervorului bulbiform se încălzește la flacără mică până când vaporii degajați împing o parte din lichidul de la partea superioară și din brațul manometrului în secțiunea manometrică a izoteniscopului, creând un spațiu umplut cu vaporii și fără azot. Izoteniscopul este introdus într-o baie termostatăă, iar presiunea azotului este corectată până la presiunea eșantionului. La echilibru, presiunea de vaporii a azotului este egală cu presiunea de vaporii a substanței.

Figura 4



În cazul substanțelor solide, în funcție de intervalul de presiune și temperatură, se utilizează lichide manometrice, precum uleiuri de silicon sau ftalați. Lichidul manometric degazat este turnat în curbura brațului lung al izoteniscopului. Apoi, substanțele solide ce urmează să fie analizate sunt puse în rezervorul bulbiform și sunt degazate la temperatură ridicată. În continuare, izoteniscopul este înclinat astfel încât lichidul manometric să curgă în tubul în formă de U.

▼ **M1**1.5.4. **Metoda prin efuziune: balanța pentru presiunea de vapori (7)**1.5.4.1. *Principiu*

Un eșantion din substanța de testat se încălzește într-un cuptor mic și se introduce într-un clopot de sticlă vidat. Cuptorul este acoperit cu un capac având găuri de mici dimensiuni de diametru cunoscut. Vaporii substanței evacuați prin una dintre găuri sunt direcționați către un taler al unei balanțe foarte sensibile aflate, de asemenea, în clopotul de sticlă vidat. În unele soluții, talerul balanței este înconjurat de o cutie de răcire, care asigură disiparea căldurii către exterior prin conducție termică, și este răcită prin iradiere, astfel încât vaporii evacuați se condensează pe acesta. Forța jetului de vapori acționează asupra balanței. Presiunea de vapori poate fi calculată în două moduri: direct din forța exercitată asupra talerului balanței, precum și din rata de evaporare, utilizând ecuația Hertz-Knudsen (2):

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

unde:

$G$  = viteza de evaporare ( $\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ )

$M$  = masa moleculară ( $\text{g mol}^{-1}$ )

$T$  = temperatura (K)

$R$  = constanta universală a gazelor ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

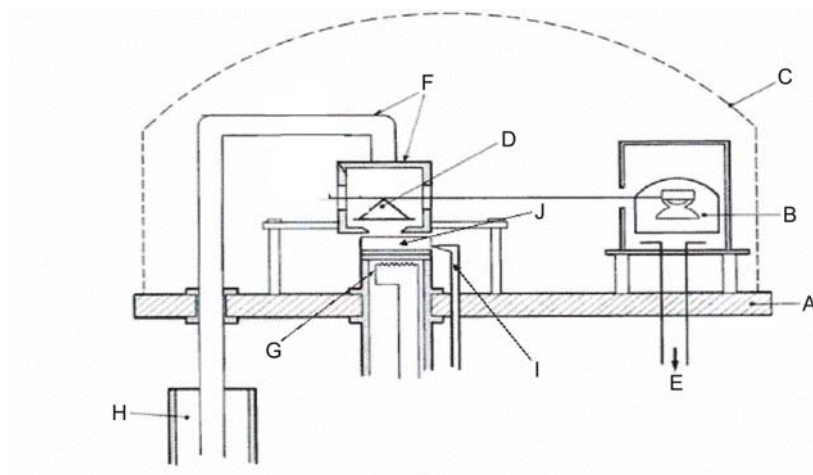
$P$  = presiunea de vapori (Pa)

Intervalul recomandat este  $10^{-3}$ -1 Pa.

1.5.4.2. *Aparatură*

Principiul general al aparatului este ilustrat în figura 5.

Figura 5



|    |                                  |    |   |
|----|----------------------------------|----|---|
| A: | Placă de bază                    | F: | Cutie de refrigerare și bară de răcire        |
| B: | Instrument cu serpentină mobilă  | G: | Cuptor evaporator                             |
| C: | Clopot de sticlă                 | H: | Vas Dewar cu azot lichid                      |
| D: | Balanță cu talere                | I: | Punct de măsurare a temperaturii eșantionului |
| E: | Dispozitiv de măsurare a vidului | J: | Substanță de testare                          |

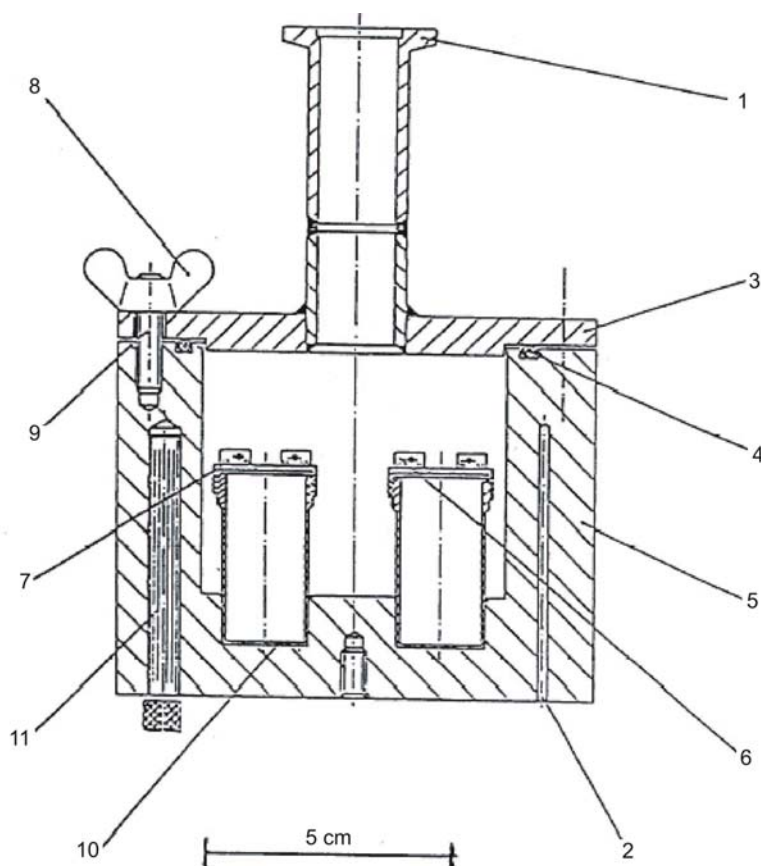
▼ **M1****1.5.5. Metoda prin efuziune: celula Knudsen****1.5.5.1. Principiu**

Metoda se bazează pe estimarea cantității de substanță analizată care se elimină în unitatea de timp dintr-o celulă Knudsen (8) sub formă de vapori, printr-un orificiu foarte mic, în condiții de vid avansat. Cantitatea de vapori degajați se poate calcula fie prin determinarea pierderii de masă a celulei, fie prin condensarea vaporilor la temperatură joasă și determinarea cantității de substanță volatilizată prin analiză cromatografică. Presiunea de vapori se calculează prin aplicarea relației Hertz-Knudsen (a se vedea punctul 1.5.4.1) cu factori de corecție care depind de parametrii aparatului (9). Intervalul recomandat este  $10^{-10}$ -1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

**1.5.5.2. Aparatură**

Principiul general al aparatului este ilustrat în figura 6.

Figura 6



- |   |  |
|---|--|
| 1: Conectare la vid   | 7: Capac filetat                           |
| 2: Tuburi pentru termometru cu rezistență de platină sau pentru controlul și măsurarea temperaturii | 8: Piuliță tip fluture                     |
| 3: Capac pentru cuva de vid   | 9: Bolțuri                                 |
| 4: Garnitură de etanșare  | 10: Celule de efuziune din oțel inoxidabil |
| 5: Cuvă de aluminiu pentru vid  | 11: Cartuș caloric                         |
| 6: Dispozitiv pentru introducerea și scoaterea celulelor de efuziune                                |  |

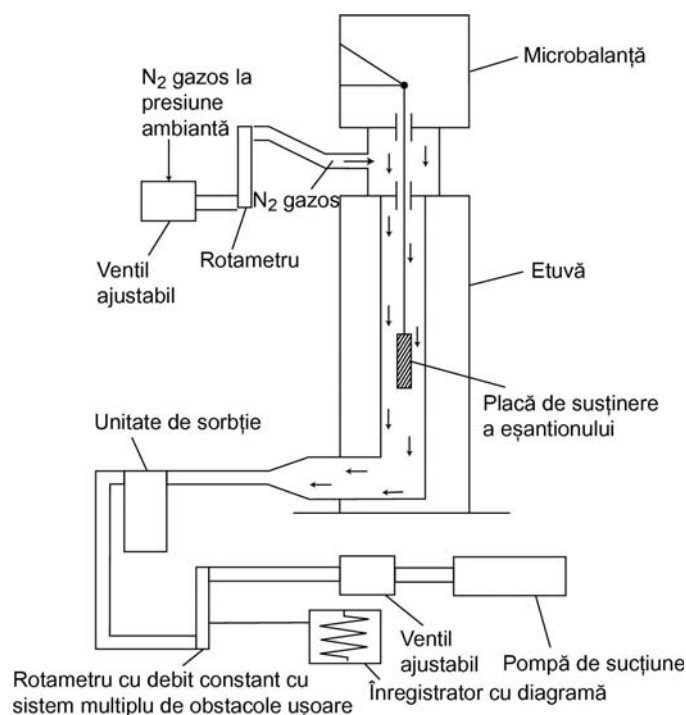
▼ **M1****1.5.6. Metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă****1.5.6.1. Principiu**

Metoda se bazează pe determinarea vitezelor de evaporare accelerată pentru substanța de test la temperaturi ridicate și presiune ambiantă prin folosirea termogravimetriei (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Vitezele de evaporare  $v_T$  rezultă din expunerea compusului selectat la o atmosferă de gaz inert cu curgere lentă și monitorizarea pierderilor de masă la temperaturi definite  $T$  izoterme în kelvin la intervale de timp corespunzătoare. Presiunile de vapori  $p_T$  sunt calculate din valorile  $v_T$  prin folosirea relației liniare între logaritmul presiunii de vapori și logaritmul ratei de evaporare. Dacă este necesar, se poate face o extrapolare la temperaturi de 20 și 25 °C prin analiza regresivă a  $\log p_T$  vs.  $1/T$ . Această metodă este adecvată pentru substanțe cu presiune de vapori de până la  $10^{-10}$  Pa ( $10^{-12}$  mbar) și cu o puritate cât mai apropiată de 100 % pentru a evita interpretarea eronată a pierderilor de masă măsurate.

**1.5.6.2. Aparatură**

Principiul general al configurației experimentale este ilustrat în figura 7.

Figura 7



Placa de susținere a eșantionului, suspendată de o microbalanță aflată într-un spațiu cu temperatură constantă, se află în calea unui curent de azot uscat care evacuează moleculele vaporizate ale substanței testate. După părăsirea spațiului, curentul de gaze este purificat de către o unitate de sorbție.

**1.5.6.3. Procedură**

Substanța testată se aplică pe suprafața unei plăci de sticlă rugoasă într-un strat omogen. În cazul substanțelor solide, placa se udă uniform cu o soluție a substanței într-un solvent adecvat și se usucă într-o atmosferă inertă. Pentru măsurare, placa astfel acoperită se suspendă într-un analizor termogravimetric și, ulterior, pierderea sa de masă se măsoară continuu în funcție de timp.

▼ **M1**

Viteza de evaporare  $v_T$  la o temperatură dată se calculează din pierderea de masă  $\Delta m$  a plăcii de eșantion prin

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

unde  $F$  este suprafața acoperită cu substanțele de test, în mod normal suprafața plăcii de eșantion, iar  $t$  este timpul pentru pierderea de masă  $\Delta m$ .

Presiunea de vapori  $p_T$  se calculează pe baza funcției vitezei de evaporare  $v_T$ :

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

unde  $C$  și  $D$  sunt constante specifice pentru sistemul experimental, în funcție de diametrul spațiului de măsurare și de viteza de scurgere a gazelor. Aceste constante trebuie să fie determinate o singură dată prin măsurarea unui set de compuși cu presiuni de vapori cunoscute și  $\log p_T$  vs.  $\log v_T$  regresiv (11)(21)(22).

Relația între presiunea de vapori  $p_T$  și temperatura  $T$  în kelvini se calculează cu ajutorul formulei

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

unde  $A$  și  $B$  sunt constante obținute prin regresiunea  $\log p_T$  vs.  $1/T$ . Prin această ecuație, presiunea de vapori poate fi calculată prin extrapolare pentru orice altă temperatură.

#### 1.5.7. Metoda gazului saturat (23)

##### 1.5.7.1. Principiu

Gazul inert este trecut, la temperatura camerei și la o viteză de curgere cunoscută, prin sau peste un eșantion al substanței testate, suficient de lent pentru a fi asigurată saturarea. Atingerea saturării în faza gazoasă este deosebit de importantă. Substanța transportată se colectează, de obicei, cu ajutorul unui absorbant, cantitatea sa fiind apoi calculată. Ca alternativă la colectarea vaporilor și analizarea lor ulterioară, pentru determinarea cantității de material transportat pot fi utilizate tehnici analitice în flux, precum cromatografia în stare gazoasă. Presiunea de vapori se calculează pornind de la ipoteza că legea gazului ideal este respectată, presiunea totală a unui amestec de gaze fiind egală cu suma presiunilor gazelor componente. Presiunea parțială a substanței de test, reprezentând presiunea de vapori, se calculează din volumul total de gaz cunoscut și greutatea materialului transportat.

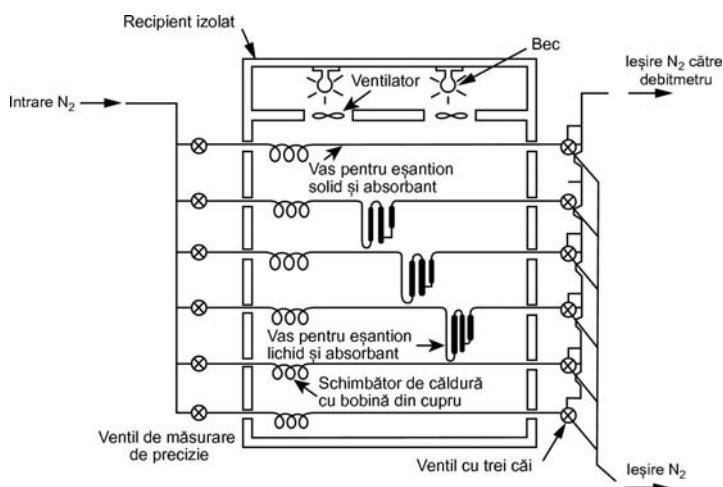
Metoda gazului saturat se aplică substanțelor chimice solide sau lichide. Poate fi folosită pentru presiuni de vapori de până la  $10^{-10}$  Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoda are eficiență maximă pentru presiuni de vapori mai mici de  $10^3$  Pa. Peste  $10^3$  Pa, presiunile de vapori sunt în general supraestimate, probabil ca urmare a formării de aerosoli. Deoarece măsurarea presiunii de vapori se face la temperatura camerei, nu este necesară extrapolarea datelor de la temperaturi mari, erorile grave provocate ca urmare a acestei extrapolări fiind astfel evitate.

##### 1.5.7.2. Aparatură

Procedura necesită folosirea unui recipient izolat termic. Schița din figura 8 ilustrează un recipient conținând câte trei vase de testare pentru eșantioane de substanțe solide și substanțe lichide, ceea ce permite o analiză triplă atât a eșantionului solid, cât și a celui lichid. Temperatura este menținută constantă cu o precizie de  $\pm 0,5$  °C sau mai mare.

▼ **M1**

Figura 8



În general, azotul este folosit ca gaz purtător inert, dar, ocazional, poate fi necesar un alt gaz (24). Gazul purtător trebuie să fie uscat. Curentul de gaz este divizat în 6 curenți, controlate prin ventile tip ac (cu orificiu de aproximativ 0,79 mm), și curge în recipient printr-un tub de cupru cu un diametru de 3,8 mm. După echilibrarea temperaturii, gazul curge prin eșantion și separatorul absorbant și iese din recipient.

Eșantioanele solide se încarcă în tuburi de sticlă cu diametru de 5 mm, fiind amplasate între dopuri din vată de sticlă (a se vedea figura 9). Figura 10 ilustrează un suport pentru eșantion lichid și un sistem absorbant. Cea mai ușor de reprodus metodă de măsurare a presiunii de vapori a lichidelor constă în acoperirea cu lichid a unor mărgeli de sticlă sau a unui absorbant inert, cum ar fi silice, iar suportul se umple cu aceste mărgeli. Ca alternativă, în gazul purtător se pot introduce frită de dimensiuni mari și bule care să treacă printr-o coloană a substanței lichide de testare.

Figura 9

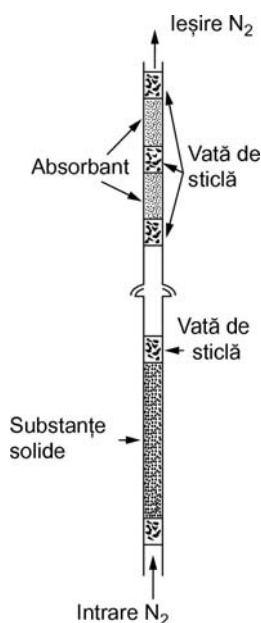
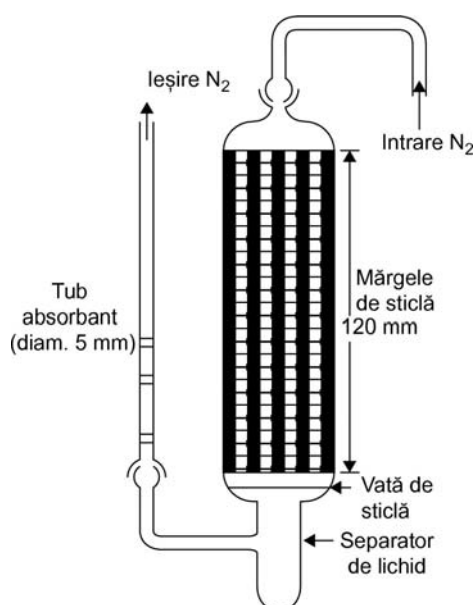


Figura 10





▼ **M1**

Sistemul absorbant este format dintr-o secțiune frontală și o secțiune de rezervă absorbante. La presiuni de vapori foarte scăzute, absorbantul reține doar cantități mici, iar adsorbția la vata de sticlă și la tubul de sticlă dintre eșantion și absorbant poate fi serios afectată.

Separatoarele răcite cu CO<sub>2</sub> solid constituie o altă metodă eficientă de colectare a materialului vaporizat. Acestea nu determină o contra-presiune pe coloana de saturare, iar îndepărtarea cantitativă a materialului separat este facilă.

1.5.7.3. *Procedură*

Viteza de curgere a gazului purtător efluent se măsoară la temperatura camerei. Viteza de curgere se verifică frecvent pe parcursul experimentului pentru a fi cunoscută valoarea exactă a volumului total de gaz purtător. Se preferă monitorizarea continuă cu un debitmetru de masă. Saturația fazei gazoase poate necesita o perioadă de contact considerabil de lungă care determină, prin urmare, viteze de curgere a gazului destul de scăzute (25).

La sfârșitul experimentului, ambele secțiuni absorbante frontală și de rezervă se analizează separat. Compusul din fiecare secțiune este desorbit prin adăugarea unui solvent. Soluțiile rezultate se analizează în mod cantitativ pentru a se determina masa desorbită din fiecare secțiune. Opțiunea asupra metodei analitice (precum și opțiunea asupra absorbantului și a solventului de desorbire) este dictată de natura materialului de testat. Eficiența desorbției se determină prin injectarea unei cantități cunoscute de eșantion în absorbant, provocând desorbirea acestuia, după care se analizează cantitatea recuperată. Este important să se verifice eficiența desorbției la sau în jurul concentrației eșantionului în condițiile de testare.

În scopul asigurării saturației gazului purtător cu substanța de testat, se folosesc trei viteze de curgere diferite. Dacă presiunea de vapori calculată nu arată că este dependentă de viteza de curgere, se presupune că gazul este saturat.

Presiunea de vapori se calculează prin ecuația:

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

unde:

p = presiunea de vapori (Pa)

W = masa de substanță de testat evaporată (g)

V = volumul de gaz saturat (m<sup>3</sup>)

R = constanta universală a gazelor 8,314 (J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

T = temperatura (K)

M = masa molară a substanței de testat (g mol<sup>-1</sup>)

Volumele măsurate trebuie să fie corectate cu privire la diferențele de presiune și temperatură între debitmetru și coloana de saturație.

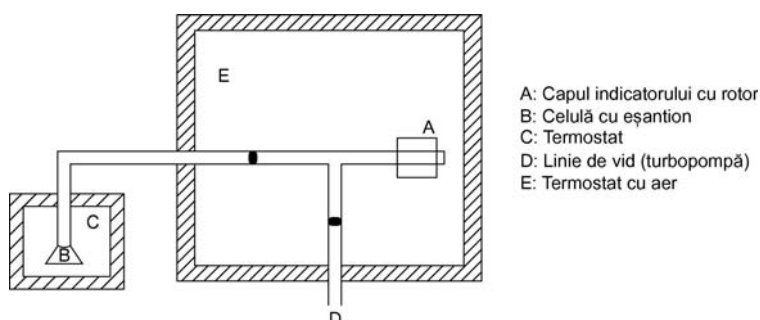
▼ **M1****1.5.8. Metoda rotorului****1.5.8.1. Principiu**

Această metodă folosește un indicator de viscozitate cu rotor, în care elementul de măsurare este o bilă mică de oțel, suspendată într-un câmp magnetic, care se rotește ca urmare a rotirii câmpurilor magnetice (26)(27)(28). Bobinele de control permit măsurarea vitezei de rotire. Când bila a atins o viteză de rotație dată, de regulă aproximativ 400 de rotații pe secundă, se oprește alimentarea bobinelor și are loc o decelerare datorată frecării cu moleculele de gaz. Scăderea vitezei de rotație este măsurată în funcție de timp. Presiunea gazului este calculată din încetinirea mișcării bilei de oțel, care este dependentă de presiune. Intervalul recomandat este  $10^{-4}$  - 0,5 Pa.

**1.5.8.2. Aparatură**

O schiță a configurației experimentale este ilustrată în figura 11. Capul de măsurare este introdus într-o incintă cu temperatură constantă, reglată cu o abatere de 0,1 °C. Recipientul conținând eșantionul este plasat într-o incintă separată, de asemenea reglată cu o abatere de 0,1 °C. Toate celelalte părți ale configurației sunt menținute la o temperatură mai înaltă, pentru a preveni condensarea. Întregul aparat este conectat la un sistem de vid avansat.

Figura 11

**2. DATE ȘI RAPORTARE****2.1. DATE**

În oricare metodă, presiunea de vapori se determină la cel puțin două temperaturi diferite. Este de preferat să se folosească trei sau mai multe temperaturi, în intervalul 0-50 °C, pentru a verifica linearitatea curbei presiunii de vapori. În cazul metodei prin efuziune (celula Knudsen și termogravimetria izotermală) și a metodei gazului saturat, pentru intervalul de temperatură se recomandă 120-150 °C, în loc de 0-50 °C.

**2.2. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele date:

— metoda folosită;

**▼ M1**

- specificațiile precise ale substanțelor (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, după caz;
- cel puțin două valori ale presiunii de vapori la temperaturi diferite – de preferință trei sau mai multe – pentru intervalul 0-50 °C (sau 120-150 °C);
- cel puțin una dintre temperaturi trebuie să fie egală cu mai mică de 25 °C, dacă este posibil din punct de vedere tehnic, în funcție de metoda aleasă;
- toate datele originale;
- o curbă log p în funcție de 1/T;
- o estimare a presiunii de vapori la 20 sau 25 °C.

Dacă se observă o transformare (schimbarea de stare, descompunere), se consemnează următoarele date:

- natura modificării;
- temperatura la care are loc transformarea corectată la presiune atmosferică;
- presiunea de vapori la 10 și 20 °C sub temperatura de tranziție și la 10 și 20 °C peste această temperatură (în afara cazului în care tranziția este de la solid la gaz).

Se consemnează toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele privitoare la impurități și starea fizică a substanței.

### 3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene* L 383 A, 26-47 (1992).
2. Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Le Neindre, B., și Vodar, B., Eds., Butterworths, Londra.
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*, ediția a doua, Van Nostrand Company, New York.
5. NF T 20-048 AFNOR (septembrie 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 (septembrie 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.

▼ **M1**

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*, ediția a douăsprezecea (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 nr. 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*, a optzeci și una ediție (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.

**▼ M1**

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., and Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
28. Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.

▼ **M1***Apendice***Metoda estimării****INTRODUCERE**

Valorile estimate ale presiunii de vapori pot fi folosite:

- pentru a stabili care metodă experimentală este cea optimă;
- pentru a furniza o estimare sau o valoare limită în cazul în care metoda experimentală nu poate să fie aplicată din cauza unor probleme tehnice.

**METODA ESTIMĂRII**

Presiunea de vapori a solidelor și lichidelor poate fi estimată folosind corelația Watson modificată (a). Singura dată experimentală necesară este punctul de fierbere în condiții normale. Metoda este aplicabilă pentru intervalul de presiune de la  $10^5$  Pa la  $10^{-5}$  Pa.

Informații detaliate asupra metodei se găsesc în „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (Manual de metode de estimare a proprietăților substanțelor) (b). A se vedea și OECD Environmental Monograph nr. 67 (c).

**METODA DE CALCUL**

Presiunea de vapori este calculată după relația:

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

unde:

T = temperatura care interesează

T<sub>b</sub> = punct de fierbere în condiții normale

P<sub>vp</sub> = presiunea de vapori la temperatura T

ΔH<sub>vb</sub> = căldura de vaporizare

ΔZ<sub>b</sub> = factor de compresibilitate (este estimat la 0,97)

m = factor empiric depinzând de starea fizică la temperatura T

în continuare,

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

unde K<sub>F</sub> este un factor empiric dependent de polaritatea substanței. Pentru unele tipuri de compuși, factorii K<sub>F</sub> sunt enumerați în referința bibliografică (b).

**▼ M1**

Adesea, există date disponibile pentru punctul de fierbere la presiune redusă. În asemenea situații, presiunea de vapori se calculează conform relației:

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

unde  $T_1$  este punctul de fierbere la presiunea redusă  $P_1$ .

**RAPORT**

În cazul în care se folosește metoda estimării, raportul de testare cuprinde o documentație cuprinzătoare a calculului utilizat.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

- (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).

**▼B****A.5. TENSIUNEA SUPERFICIALĂ****1. METODĂ**

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt menționate în referința bibliografică 2.

**1.1. INTRODUCERE**

Metodele descrise se aplică măsurării tensiunii superficiale a soluțiilor apoase.

Este util să se colecteze informații preliminare asupra solubilității în apă, structurii, proprietăților la hidroliză și concentrației critice pentru formarea de miceli ale substanței înainte de realizarea acestor teste.

Următoarele metode sunt aplicabile celor mai multe substanțe chimice, fără nicio restricție cu privire la gradul de puritate.

Măsurarea tensiunii superficiale prin metoda tensiometrului cu inel se limitează la soluțiile apoase cu o vâscozitate dinamică mai mică decât aproximativ 200 mPa s.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Entalpia unui lichid la suprafața de contact cu aerul raportată la unitatea de suprafață se numește tensiune superficială.

Unitățile de măsură sunt:

N/m (SI) sau

mN/m (subunitate SI)

$1 \text{ N/m} = 10^3 \text{ dyn/cm}$

$1 \text{ mN/m} = 1 \text{ dyn/cm}$  în sistemul CGS vechi

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Substanțele de referință care acoperă un interval larg de tensiuni superficiale sunt date în referințele 1 și 3.

**1.4. PRINCIPIUL METODELOR**

Metodele se bazează pe măsurarea forței maxime care este necesar să se exercite vertical pe o bridă circulară ori pe un inel aflat în contact cu suprafața lichidului dintr-un vas etalonat, pentru a-l separa de această suprafață, sau pe o placă având o margine în contact cu suprafața lichidului, pentru a ridica pelicula care s-a format.

Substanțele care sunt solubile în apă cel puțin într-o concentrație de 1 mg/l sunt analizate în soluții apoase la o singură concentrație.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Aceste metode oferă o precizie mai mare decât este probabil necesară în analizele de mediu.



**▼B****1.6. DESCRIEREA METODELOR**

Se prepară o soluție a substanței de testat în apă distilată. Concentrația acestei soluții reprezintă 90 % din solubilitatea de saturație a substanței în apă; când această concentrație depășește 1 g/l, pentru determinare se utilizează o concentrație de 1 g/l. Testarea substanțelor cu solubilitate în apă mai scăzută de 1 mg/l nu este necesară.

**1.6.1. Metoda cu placă**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (Agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid).

**1.6.2. Metoda cu bridă**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid)

**1.6.3. Metoda cu inel**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (Agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid).

**1.6.4. Metodă cu inel corelată cu principiile OCDE****1.6.4.1. Aparatură**

Pentru această măsurătoare sunt folosite tensiometre comerciale. Ele constau în următoarele elemente:

— porțanșion mobil;

— dinamometru;

— corp de măsurare (inel);

— vas de măsurare.

**1.6.4.1.1. Porțanșionul mobil**

Porțanșionul mobil se folosește ca suport al recipientului de măsurare termostatat care conține lichidul de testare. Se montează pe același soclu ca și dinamometrul.

**1.6.4.1.2. Dinamometrul**

Dinamometrul (a se vedea figura) se așează deasupra porțanșionului. Eroarea în măsurarea forței nu trebuie să depășească  $\pm 10^{-6}$  N, echivalentul unei limite de eroare de  $\pm 0,1$  miligrame în măsurarea masei. În majoritatea cazurilor, scara de măsură a tensiometrelor comercializate este etalonată în mN/m, astfel încât se poate citi direct tensiunea superficială în mN/m, cu o precizie de 0,1 mN/m.

▼ B

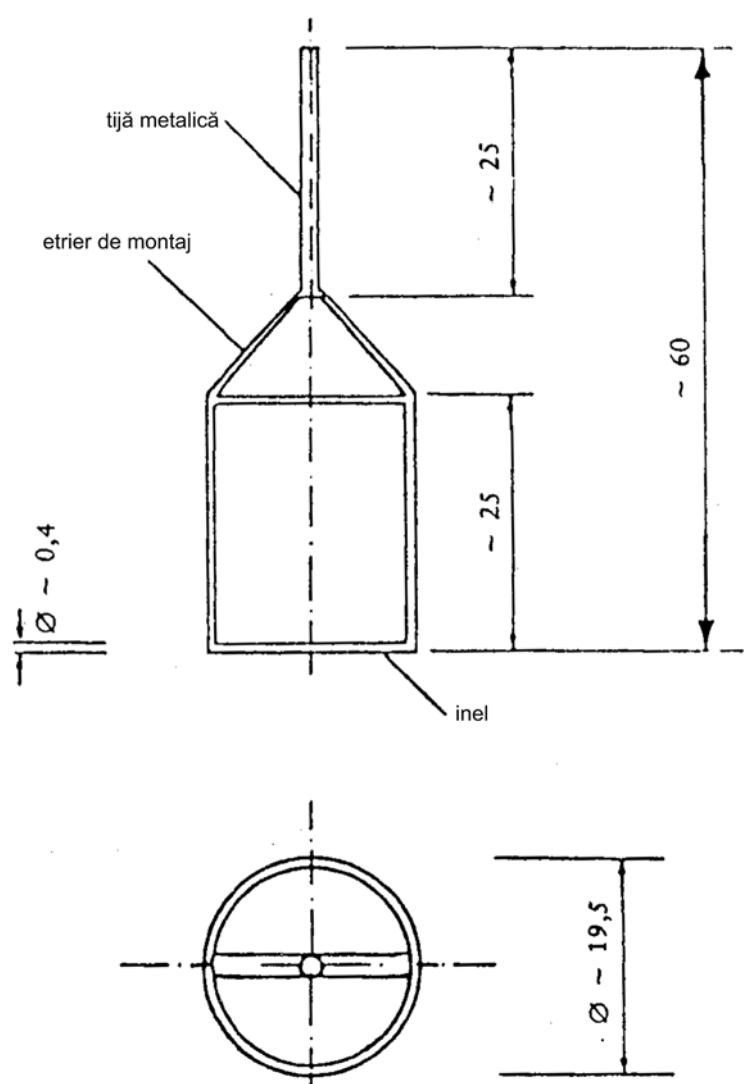
## 1.6.4.1.3. Corpul de măsurare (inel)

Inelul este de obicei format dintr-un film de platină sau de platină-iridiu cu o grosime de 0,4 milimetri și o circumferință de 60 milimetri. Acest inel este suspendat orizontal pe etrierul de montaj care este legat printr-o tijă metalică la dinamometru (a se vedea figura).

*Figură*

## Corp de măsurare

(Toate dimensiunile sunt exprimate în milimetri)



## 1.6.4.1.4. Vasul de măsurare

Vasul de măsurare conținând proba ce urmează să fie măsurată trebuie să fie un vas de sticlă cu termostat. Acesta trebuie să fie astfel realizat încât în timpul măsurărilor temperatura soluției de lichid și a fazei gazoase de deasupra acesteia să rămână constantă, astfel încât proba să nu se poată evapora. Sunt acceptabile vase cilindrice de sticlă cu diametrul interior mai mare de 45 mm.

**▼B**1.6.4.2. *Pregătirea aparaturii*1.6.4.2.1. *Curățarea*

Vasele de sticlă se spală cu atenție. Dacă este necesar, sunt spălate cu amestec oxidant (bicromat/acid sulfuric) cald apoi cu acid fosforic concentrat (83-98 % procent de greutate  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), clătite cu apă și în final spălate cu apă dublu distilată până la reacție neutră, apoi uscate sau clătite cu o parte din lichidul de analizat.

Inelul este mai întâi clătit bine cu apă pentru a îndepărta orice substanță solubilă, scufundat rapid în amestec oxidant, spălat cu apă dublu distilată până la reacție neutră și în final încălzit scurt deasupra unei flăcări de metanol.

*Notă:*

Substanțele contaminante care nu se dizolvă și nu sunt distruse de amestecul oxidant sau de acidul fosforic, precum siliconii, vor fi îndepărtate cu ajutorul unui solvent organic potrivit.

1.6.4.2.2. *Calibrarea aparatului*

Validarea aparatului constă din verificarea punctului zero și corectarea acestuia astfel încât indicația instrumentului să permită realizarea unor determinări corecte în unități mN/m.

*Montare:*

Aparatul va fi așezat plan, de exemplu cu ajutorul unei nivele cu bulă de aer așezată la baza termometrului, prin ajustarea picioarelor mobile.

*Corectarea punctului zero:*

După montarea inelului pe aparat și înaintea imersării în lichid, indicația tensiometrului va fi corectată la zero, iar inelul se va verifica pentru a fi perfect paralel cu suprafața lichidului. În acest scop, suprafața lichidului poate fi folosită ca oglindă.

*Calibrarea:*

Testul de calibrare poate fi realizat prin una din următoarele metode:

- (a) folosind o greutate: metoda folosește călăreți de masă cunoscută între 0,1 și 1,0 g amplasați pe inel. Factorul de calibrare  $\Phi_a$  cu care se înmulțesc toate citirile de pe instrument se stabilește în conformitate cu ecuația (1):

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

unde:

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

$m$  = masa călărețului (g)

$g$  = accelerația gravitațională ( $981 \text{ cm s}^{-2}$  la nivelul mării)

$b$  = circumferința medie a inelului (cm)

$\sigma_a$  = citirea tensiometrului după plasarea călărețului pe inel (mN/M);

**▼ B**

- (b) folosind apa: procedeul utilizează apa pură a cărei tensiune superficială la, de exemplu 23 °C, este egală cu 72,3 mN/m. Acest procedeu se realizează mai rapid decât calibrarea cu greutate, dar există întotdeauna pericolul ca tensiunea superficială a apei să fie falsificată prin contaminare cu agenți tensioactivi.

Factorul de calibrare ( $\Phi_b$ ) cu care se înmulțesc toate citirile de pe instrument se stabilește în conformitate cu ecuația (2):

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

unde:

$\sigma_o$  = valoarea citată în literatură pentru tensiunea superficială a apei (în mN/m)

$\sigma_g$  = valoarea măsurată a tensiunii superficiale a apei (mN/m) ambele la aceeași temperatură.

#### 1.6.4.3. *Prepararea eșantioanelor*

Soluțiile apoase se prepară din substanța de testat folosind concentrația necesară în apă și nu conțin nicio substanță nedizolvată.

Soluția trebuie păstrată la o temperatură constantă ( $\pm 0,5$  °C). Deoarece tensiunea superficială a unei soluții într-un vas variază în timp, se realizează măsurători la anumite intervale de timp și se trasează graficul tensiunii superficiale ca funcție de timp. Atunci când nu se mai produce nicio modificare se consideră că s-a atins starea de echilibru.

Contaminarea cu praf sau gaze din mediul înconjurător poate modifica rezultatele, așadar se va lucra sub clopot de protecție.

#### 1.6.5. **Condiții experimentale**

Măsurătorile se efectuează la temperatura de aproximativ 20 °C controlată la  $\pm 0,5$  °C.

#### 1.6.6. **Desfășurarea testului**

Soluțiile ce urmează să fie măsurate se transferă cu atenție într-un vas de măsurare curat, evitându-se spumarea, după care vasul de măsurare se așează pe porțelan. Acesta se ridică până când inelul este imersat sub suprafața soluției de măsurat. Se coboară apoi treptat și uniform (la o viteză de aproximativ 0,5 cm/min) pentru desprinderea inelului de pe suprafață până la atingerea forței maxime necesare. Stratul de lichid atașat de inel trebuie să nu fie separat de inel. După terminarea măsurării, inelul se imersează din nou în lichid, iar măsurătorile se repetă până când se ajunge la o valoare constantă a tensiunii superficiale. Timpul scurs de la transferul soluției în vasul de măsurare se înregistrează pentru fiecare determinare. Citirile se efectuează la forța maximă necesară pentru desprinderea inelului de suprafața lichidului.

**▼ B****2. DATE**

Pentru a calcula tensiunea superficială, valoarea citită în mN/m pe aparat este în primul rând multiplicată cu un factor de calibrare  $\Phi_a$  sau  $\Phi_b$  (în funcție de procedura de calibrare utilizată). Acest rezultat este aproximativ și ca urmare trebuie să fie corectat ulterior.

Harkins și Jordan (4) au determinat un factor de corecție empiric pentru valorile de tensiune superficială măsurate prin metoda cu inel, care depinde de dimensiunile inelului, densitatea lichidului și tensiunea superficială.

Deoarece determinarea factorului de corecție pentru fiecare măsurătoare individuală din tabelele lui Harkins și Jordan este laborioasă, pentru a determina tensiunea superficială la soluții apoase poate fi folosită metoda simplificată de a citi valorile corectate de tensiune superficială direct din tabel. (În cazul citirilor situate între valorile tabelate se va folosi metoda interpolării.)

*Tabel***Corecția tensiunii superficiale măsurate**

numai pentru soluții apoase,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

|   |                                   |  |
|---|-----------------------------------|--|
| r | = 9,55 mm (raza medie a inelului) |  |
| r | = 0,185 mm (raza sârmei inelului) |  |

| Valoare experimentală mN/m | Valoare corectată (mN/m)                        |  |
|----------------------------|---|--|
|                            | Calibrarea greutății [a se vedea 1.6.4.2.2 (a)] | Calibrarea apei [a se vedea 1.6.4.2.2 (b)] |
| 20                         | 16,9  | 18,1                                       |
| 22                         | 18,7  | 20,1                                       |
| 24                         | 20,6  | 22,1                                       |
| 26                         | 22,4  | 24,1                                       |
| 28                         | 24,3  | 26,1                                       |
| 30                         | 26,2  | 28,1                                       |
| 32                         | 28,1  | 30,1                                       |
| 34                         | 29,9  | 32,1                                       |
| 36                         | 31,8  | 34,1                                       |
| 38                         | 33,7  | 36,1                                       |
| 40                         | 35,6  | 38,2                                       |
| 42                         | 37,6  | 40,3                                       |
| 44                         | 39,5  | 42,3                                       |
| 46                         | 41,4  | 44,4                                       |
| 48                         | 43,4  | 46,5                                       |
| 50                         | 45,3  | 48,6                                       |
| 52                         | 47,3  | 50,7                                       |
| 54                         | 49,3  | 52,8                                       |
| 56                         | 51,2  | 54,9                                       |

**▼B**

| Valoare experimentală mN/m | Valoare corectată (mN/m)                        |  |
|----------------------------|---|--|
|                            | Calibrarea greutății [a se vedea 1.6.4.2.2 (a)] | Calibrarea apei [a se vedea 1.6.4.2.2 (b)] |
| 58                         | 53,2  | 57,0                                       |
| 60                         | 55,2  | 59,1                                       |
| 62                         | 57,2  | 61,3                                       |
| 64                         | 59,2  | 63,4                                       |
| 66                         | 61,2  | 65,5                                       |
| 68                         | 63,2  | 67,7                                       |
| 70                         | 65,2  | 69,9                                       |
| 72                         | 67,2  | 72,0                                       |
| 74                         | 69,2  | —  |
| 76                         | 71,2  | —  |
| 78                         | 73,2  | —  |

Acest tabel a fost realizat pe baza corecției Harkins-Jordan. Tabelul este similar cu cel din standardul DIN (DIN 53914) pentru apă și soluții apoase ( $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ) și se referă la un inel disponibil în comerț cu diametru de  $R = 9,55 \text{ mm}$  (însemnând raza medie a inelului) și  $r = 0,185 \text{ mm}$  (raza sârmei inelului). Tabelul conține valori corectate pentru măsurătorile de tensiune superficială făcute după calibrarea cu greutăți sau cu apă.

Alternativ, în absența procedurii de calibrare, tensiunea superficială poate să fie calculată conform formulei:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

unde:

$F$  = forța măsurată la dinamometru la întreruperea filmului

$R$  = raza inelului

$f$  = factor de corecție (1)

### 3. RAPORT

#### 3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele date:

— metoda folosită;

— tipul de apă sau soluție folosită;

— specificațiile precise ale substanțelor (identitate, impurități);

— rezultatele măsurătorii: tensiune superficială (citire) menționând citiri individuale și media lor aritmetică, precum și media corectată (luând în considerare factorul de echipament și tabelul cu factorii de corecție);

**▼B**

- concentrația soluției;
- temperatura de testare;
- vechimea soluției folosite; în particular timpul scurs între prepararea și măsurarea soluției;
- descrierea tensiunii superficiale ca funcție de timp după transferul soluției la vasul de măsurare;
- toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor ce urmează a fi raportate, în special cu privire la impurități și starea fizică a substanței.

### 3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Având în vedere că apa distilată are tensiunea superficială de 72,75 mN/m la 20 °C, substanțele prezentând o tensiune superficială mai scăzută de 60 mN/m în condițiile acestei metode sunt considerate ca fiind agenți activi de suprafață.

### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter XIV.
3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.
4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

▼ **M4****A.6. SOLUBILITATEA ÎN APĂ****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 105 (1995) a OCDE. Această metodă de testare este o versiune revizuită a Orientării 105 originale, care a fost adoptată în 1981. Nu există nicio diferență de substanță între versiunea curentă și cea din 1981. A fost modificat, în principal, formatul. Revizuirea s-a bazat pe metoda de testare UE „Solubilitatea în apă” <sup>(1)</sup>.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

2. Solubilitatea în apă a unei substanțe poate fi considerabil afectată de prezența impurităților. Această metodă de testare abordează determinarea solubilității în apă a substanțelor în esență pure care sunt stabile în apă și nu sunt volatile. Pentru determinarea solubilității în apă sunt necesare anumite informații preliminare referitoare la substanța testată, cum ar fi formula structurală, presiunea de vapori, constanta de disociere și hidroliza în funcție de pH.
3. În această metodă de testare sunt descrise două metode, cea a eluției pe coloană și metoda flaconului, care acoperă solubilități sub, respectiv peste  $10^{-2}$  g/l. Este descris, de asemenea, un test preliminar simplu. El permite determinarea cantității adecvate aproximative de probă folosite în testul final, precum și a timpului necesar pentru atingerea saturației.

**DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

4. Solubilitatea în apă a unei substanțe reprezintă concentrația masică de saturație a substanței în apă la o temperatură dată.
5. Solubilitatea în apă este exprimată ca masa de solut raportată la volumul de soluție. Unitatea SI este  $\text{kg/m}^3$ , dar se poate folosi și g/l.

**SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ**

6. Nu este necesar să se folosească substanțe chimice de referință în toate cazurile în care se studiază o substanță testată.

**DESCRIEREA METODELOR****Condițiile de testare**

7. De preferință, testul se efectuează la  $20 \pm 0,5$  °C. Temperatura aleasă trebuie să fie menținută constantă în toate părțile relevante ale echipamentului.

**Testul preliminar**

8. În cadrul unei proceduri secvențiale, se adaugă volume tot mai mari de apă la temperatura camerei, la aproximativ 0,1 g probă (substanțele testate solide se pulverizează) într-un cilindru gradat de 10 ml cu dop din sticlă. După fiecare adăugare a unei cantități de apă, amestecul este agitat timp de 10 minute și examinat vizual pentru a observa dacă există părți nedizolvate din probă. Dacă, după adăugarea a 10 ml de apă, proba sau părți din ea rămân nedizolvate, experimentul este continuat într-un cilindru gradat de 100 ml. Solubilitatea aproximativă este indicată în tabelul 1, sub volumul de apă



▼ **M4**

adăugată la care are loc dizolvarea completă a probei. În cazul în care solubilitatea este redusă, poate fi necesar un timp îndelungat pentru dizolvarea substanței testate și trebuie să se lase să treacă cel puțin 24 de ore. Dacă după 24 de ore substanța testată nu este încă dizolvată, se lasă mai mult timp (maximum 96 de ore) sau se încearcă diluarea în continuare, pentru a stabili dacă trebuie folosită metoda eluției pe coloană sau metoda flaconului.

Tabelul 1

| ml apă pentru 0,1 g solubil      | 0,1     | 0,5               | 1               | 2              | 10            | 100          | > 100 |
|----------------------------------|---------|-------------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|-------|
| Solubilitate aproximativă în g/l | > 1 000 | 1 000 până la 200 | 200 până la 100 | 100 până la 50 | 50 până la 10 | 10 până la 1 | < 1   |

**Metoda eluției pe coloană***Principiu*

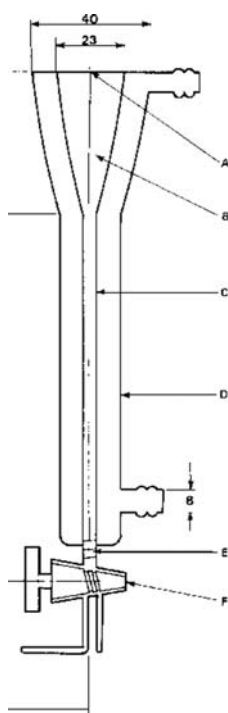
- Această metodă se bazează pe eluția substanței testate cu apă dintr-o microcoloană încărcată cu un suport inert, acoperită în prealabil în exces cu substanța testată (2). Solubilitatea în apă este dată de concentrația masică a eluatului atunci când aceasta a atins un platou, ca funcție de timp.

*Aparatură*

- Aparatura constă într-o microcoloană (figura 1), menținută la temperatură constantă. Ea este conectată la o pompă de recirculare (figura 2) sau la un vas de nivel (figura 3). Microcoloana conține un suport inert menținut pe poziție de un mic dop din vată de sticlă, care servește, de asemenea, la filtrarea particulelor. Ca suport se pot utiliza măgelele de sticlă, pământul de diatomee sau alte materiale inerte.
- Microcoloana prezentată în figura 1 este adecvată pentru configurația cu pompă de recirculare. Ea are un spațiu liber pentru cinci volume (eliminate la începutul experimentului) și volumul a cinci probe (prelevate pentru analiză în timpul experimentului). Ca alternativă, dimensiunea poate fi redusă dacă se poate adăuga apă în sistem în timpul experimentului pentru a înlocui cele cinci volume inițiale îndepărtate cu impuritățile. Coloana este conectată, prin intermediul unor tuburi dintr-un material inert, la pompa de recirculare, capabilă să asigure un debit de aproximativ 25 ml/h. Pompa de recirculare poate fi, de exemplu, o pompă peristaltică sau cu membrană. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita contaminarea și/sau adsorbția în contact cu materialul tuburilor.
- O configurație schematică ce utilizează un vas de nivel este prezentată în figura 3. În această configurație, microcoloana este prevăzută cu un robinet cu o cale. Conectarea la vasul de nivel se face prin intermediul unei îmbinări din sticlă rodată și a unor tuburi dintr-un material inert. Debitul de la vasul de nivel trebuie să fie de aproximativ 25 ml/h.

▼ **M4**

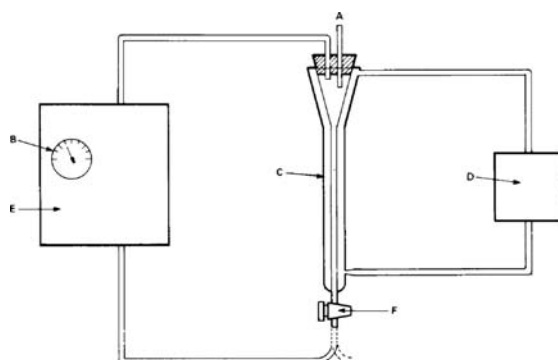
Figura 1



Dimensiuni, în mm

- A. Racord pentru îmbinarea din sticlă rodată
- B. Spațiu liber
- C. Diametru interior 5
- D. Diametru exterior 19
- E. Dop din vată de sticlă
- F. Robinet

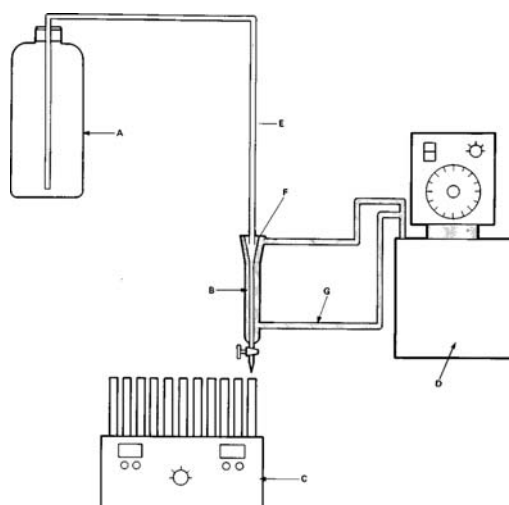
Figura 2



- A. Echilibrare atmosferică
- B. Debitmetru
- C. Microcoloană
- D. Pompă de circulație termostată
- E. Pompă de recirculare
- F. Robinet cu două căi pentru prelevare probe

▼ **M4**

Figura 3



- A. Vas de nivel (de exemplu, balon de 2,5 litri)
- B. Coloană
- C. Colector de fracțiuni
- D. Termostat
- E. Tub de teflon
- F. Îmbinare din sticlă rotată
- G. Conductă de apă (între termostat și coloană, diametrul interior aproximativ 8 mm)
13. Aproximativ 600 mg din materialul-suport sunt transferate într-un balon de 50 ml cu fund rotund. O cantitate adecvată de substanță testată se dizolvă într-un solvent volatil cu o calitate de reactiv analitic și o cantitate corespunzătoare din această soluție se adaugă la materialul-suport. Solventul este evaporat complet, de exemplu prin folosirea unui evaporator rotativ, deoarece, în caz contrar, saturația cu apă a suportului nu s-ar atinge în timpul etapei de eluție, din cauza partiției la suprafață. Suportul încărcat se lasă să se îmbibe timp de două ore în aproximativ 5 ml de apă, apoi suspensia se adaugă în microcoloană. Ca alternativă, suportul uscat poate fi introdus în microcoloana care a fost deja umplută cu apă și apoi lăsat timp de aproximativ 2 ore, până la atingerea echilibrului.
14. Încărcarea suportului poate genera probleme, conducând la rezultate eronate, de exemplu dacă substanța testată este depusă ca fază uleioasă. Aceste probleme trebuie să fie examinate și să se consemneze detaliile.

*Procedura cu pompă de recirculare*

15. Se pornește circulația prin coloană. Se recomandă utilizarea unui debit de aproximativ 25 ml/h, corespunzând la 10 volume pe oră pentru coloana descrisă. Cel puțin primele cinci volume se elimină, pentru a îndepărta impuritățile solubile în apă. Apoi, pompa de recirculare se lasă să funcționeze până la stabilirea echilibrului, care este definit prin 5 probe succesive ale căror concentrații nu diferă cu mai mult de  $\pm 30\%$ , în mod aleatoriu. Aceste probe sunt separate între ele prin intervale de timp corespunzătoare trecerii a cel puțin 10 volume. În funcție de metoda analitică folosită, poate fi preferabil să se realizeze o curbă concentrație/timp, pentru a indica atingerea echilibrului.

**▼M4***Procedura cu vas de nivel*

16. Frațiuni succesive de eluat se colectează și se analizează prin metoda aleasă. Pentru a determina solubilitatea, se folosesc acele fracțiuni din intervalul de eluție mediu, unde concentrațiile sunt constante în limita a  $\pm 30\%$  pentru cel puțin 5 fracțiuni consecutive.
17. Apa dublu distilată este eluentul preferat. Se poate folosi și apă deionizată cu o rezistivitate peste 10 M $\Omega$ cm și un conținut de carbon organic total sub 0,01 %.
18. În cadrul ambelor proceduri, o a doua serie se efectuează la jumătate din debitul primei serii. Dacă rezultatele celor două serii sunt în concordanță, testul este satisfăcător. Dacă solubilitatea măsurată este mai mare la debitul mai mic, atunci înjumătățirea debitului va trebui să continue până când se va obține aceeași solubilitate în două serii succesive.
19. În ambele proceduri, fracțiunile se verifică pentru a decela prezența de particule coloidale, prin examinarea efectului Tyndall. Prezența unor particule invalidează testul și acesta se repetă după îmbunătățirea acțiunii de filtrare a coloanei.
20. Se măsoară pH-ul fiecărei probe, preferabil folosind benzi indicatoare speciale.

**Metoda prin solubilitate în flacon***Principiu*

21. Substanța testată (solidele se pulverizează) se dizolvă în apă la o temperatură puțin mai mare decât temperatura de testare. Când se atinge saturația, amestecul se răcește și se păstrează la temperatura de testare. Ca alternativă, determinarea poate fi efectuată direct la temperatura de testare, dacă se asigură, prin prelevare de probe adecvată, faptul că s-a atins starea de echilibru de saturație. Apoi se determină, printr-o metodă analitică adecvată (3), concentrația masică a substanței testate în soluția apoasă, care nu trebuie să conțină niciun fel de particule nedizolvate.

*Aparatură*

22. Sunt necesare următoarele materiale:
  - sticlărie și instrumente obișnuite de laborator;
  - un dispozitiv pentru agitarea soluțiilor la temperatură constantă controlată;
  - o centrifugă (preferabil termostatăată), dacă este necesar în cazul emulsiilor; și
  - echipament de analiză.

*Procedură*

23. Cantitatea de substanță testată necesară pentru a satura volumul de apă dorit este estimată printr-un test preliminar. Aproximativ de cinci ori din acea cantitate este cântărită în fiecare dintre cele trei vase de sticlă prevăzute cu dopuri de sticlă (de exemplu, eprubete pentru centrifugă, flacoane). În fiecare vas se adaugă un volum de apă, ales în funcție de metoda analitică și de domeniul de solubilitate. Vasele sunt închise etanș și apoi agitate la 30 °C. Se folosește un dispozitiv de agitare sau de amestecare ce poate funcționa la temperatură constantă, de exemplu, un agitator magnetic într-o baie de apă termostatăată. După o zi, unul dintre vase este lăsat timp de 24 de ore la temperatura de testare, pentru echilibrare, agitându-l din când în când. Conținutul vasului este apoi centrifugat la temperatura de testare și se

**▼M4**

determină concentrația de substanță testată în faza apoasă limpede, printr-o metodă analitică adecvată. Celelalte două flacoane sunt tratate similar, după atingerea echilibrului inițial la 30 °C timp de 2, respectiv 3 zile. În cazul în care concentrațiile măsurate cel puțin în ultimele două vase nu diferă cu mai mult de 15 %, testul este considerat satisfăcător. Întregul test se repetă, folosind durate de echilibrare mai lungi, dacă rezultatele de la vasele 1, 2 și 3 prezintă o tendință de creștere a valorilor.

24. Testul se poate efectua, de asemenea, fără preincubare la 30 °C. Pentru a estima durata necesară stabilirii echilibrului de saturație, se prelevează probe până în momentul în care timpul de agitare nu mai influențează concentrațiile măsurate.
25. Se măsoară pH-ul fiecărei probe, preferabil folosind benzi indicatoare speciale.

**Determinări analitice**

26. Pentru aceste determinări se preferă o metodă analitică specifică substanței, deoarece cantități mici de impurități solubile pot genera erori mari la măsurarea solubilității. Exemple de astfel de metode sunt: cromatografia în fază gazoasă sau lichidă, titrarea, fotometria, voltametria.

**DATE ȘI RAPORT****Date***Metoda eluției pe coloană*

27. Pentru fiecare serie, se vor calcula valoarea medie și deviația standard obținută de la cel puțin cinci probe consecutive prelevate în zona platoului de saturație. Valorile medii obținute din două teste cu debite diferite nu trebuie să difere cu peste 30 %.

*Metoda prin solubilitate în flacon*

28. Se face media rezultatelor individuale de la fiecare dintre cele trei flacoane, care nu trebuie să difere cu mai mult de 15 %.

**Raport de testare***Metoda eluției pe coloană*

29. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

- rezultatele testului preliminar;
- identitatea chimică și impurități (etapă de purificare preliminară, dacă este cazul);
- concentrațiile, debitele și pH-ul pentru fiecare probă;
- mediile și deviațiile standard de la cel puțin cinci probe din zona platoului de saturație pentru fiecare testare;
- media a cel puțin două testări succesive;
- temperatura apei în timpul procesului de saturație;
- metoda de analiză;
- natura suportului utilizat;
- cantitatea de substanță depusă pe suport;
- solventul folosit;
- dovezi despre orice instabilitate chimică a substanței în timpul testării;
- toate informațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special referitoare la impurități și starea fizică a substanței testate.

**▼ M4***Metoda prin solubilitate în flacon*

30. Raportul de testare include următoarele date:

- rezultatele testului preliminar;
- identitatea chimică și impurități (etapă de purificare preliminară, dacă este cazul);
- determinările analitice individuale și media lor, acolo unde a fost determinată mai mult decât o valoare pentru fiecare flacon;
- pH-ul fiecărei probe;
- media valorilor pentru flacoanele diferite aflate în concordanță;
- temperatura de testare;
- metoda analitică;
- dovezi despre orice instabilitate chimică a substanței în timpul testului;
- toate informațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special referitoare la impurități și starea fizică a substanței testate.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Directiva 92/69/CEE a Comisiei din 31 iulie 1992 de efectuare a celei de-a șaptezecea adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (JO L 383, 29.12.1992, p. 113).
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985), Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985), Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

**▼B****A.8. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE****1. METODĂ**

Metoda „agitării flaconului” descrisă se bazează pe orientările OCDE privind testele (1).

**1.1. INTRODUCERE**

Pentru efectuarea acestui test este util să se colecteze informații preliminare despre formula structurală, constanta de disociere, solubilitatea în apă, hidroliză, solubilitatea în n-octanol și tensiunea superficială a substanței.

Măsurătorile se fac pe substanțe ionizabile, numai în forma lor neionizată (acizi liberi și baze libere) produse prin folosirea unei soluții tampon adecvate, cu un pH de cel puțin o unitate de mai mic (acizi liberi) sau mai mare (baze libere) decât pK.

Această metodă de analiză include două metode separate: metoda „agitării flaconului” și cromatografia lichidă de mare performanță (HPLC). Prima este aplicabilă când valoarea  $\log P_{ow}$  (pentru definiții a se vedea mai jos) este în intervalul de la -2 la 4, iar cea de-a doua în intervalul de la 0 la 6. Înainte de a aplica oricare dintre metodele experimentale se obține o estimare a coeficientului de partiție.

Metoda agitării flaconului se aplică numai substanțelor pure solubile în apă și în n-octanol. Nu este aplicabilă agenților tensioactivi (pentru care se furnizează o valoare calculată sau estimată a solubilității individuale în apă și n-octanol).

Metoda HPLC nu este aplicabilă acizilor și bazelor puternice, complexilor metalici, agenților tensioactivi sau substanțelor care reacționează cu eluentul. Pentru aceste materiale se furnizează valori calculate sau estimate ale solubilității individuale în apă și n-octanol.

Metoda HPLC este mai puțin sensibilă la prezența impurităților din probă decât metoda agitării flaconului. Cu toate acestea, în unele cazuri impuritățile pot face interpretarea rezultatelor dificilă pentru că identificarea picurilor devine incertă. Pentru amestecuri care dau o bandă imprecisă se menționează limitele superioară și inferioară ale  $\log P$ .

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Coeficientul de partiție (P) este definit ca raportul dintre concentrațiile de echilibru ( $c_i$ ) ale substanței dizolvate în sistemul bifazic constând din doi solvenți aproape nemiscibili. În cazul n-octanol și apă:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Coeficientul de partiție (P) este prin urmare raportul dintre două concentrații și de regulă este exprimat ca logaritm în baza 10 ( $\log P$ ).

**▼B****1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ***Metoda agitării flaconului*

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

*Metoda HPLC*

Pentru a corela datele despre un compus determinate prin HPLC cu valoarea sa  $P$ , trebuie stabilit un grafic de calibrare  $\log P$  vs. date cromatografice, folosind cel puțin 6 puncte de referință. Utilizatorul trebuie să selecteze substanțele de referință adecvate. Dacă este posibil, cel puțin un compus de referință trebuie să aibă  $P_{ow}$  mai ridicat decât substanța de testat și un altul – un  $P_{ow}$  mai scăzut decât eșantionul. Pentru valorile  $\log P$  mai mici de 4, calibrarea se poate baza pe datele obținute prin metoda agitării flaconului. Pentru valori  $\log P$  mai mari de 4, calibrarea se poate baza pe valori recunoscute din literatură, dacă acestea sunt în concordanță cu valorile calculate. Pentru o mai mare acuratețe, este preferabil să se aleagă compuși de referință care sunt înrudiți structural cu substanța de testat.

Este disponibilă o listă exhaustivă de valori pentru  $\log P_{ow}$  pentru mai multe grupe de substanțe chimice (2) (3). Dacă nu sunt disponibile date despre coeficienții de partiție ai compușilor înrudiți structural, atunci poate fi folosită o calibrare mai generală, stabilită cu alți compuși de referință.

În apendicele 2 figurează o listă a substanțelor de referință recomandate care cuprinde și valori pentru  $P_{ow}$ .

**1.4. PRINCIPIUL METODEI****1.4.1. Metoda agitării flaconului**

Pentru a determina coeficientul de partiție trebuie realizat echilibrul între toți componenții sistemului care interacționează și trebuie determinate concentrațiile substanțelor dizolvate în cele două faze. Un studiu asupra literaturii de specialitate dedicată acestui subiect indică mai multe tehnici diferite ce pot fi folosite pentru rezolvarea acestei probleme, de exemplu prin amestecarea completă a două faze urmată de separarea lor pentru a determina concentrația de echilibru a substanței.

**1.4.2. Metoda HPLC**

HPLC este efectuat într-o coloană analitică umplută cu o fază solidă disponibilă în comerț care conține lanțuri lungi de hidrocarburi (de exemplu  $C_8$ ,  $C_{18}$ ) legate chimic pe silice. Substanțele injectate într-o astfel de coloană se mișcă de-a lungul ei cu diferite viteze din cauza gradelor diferite de partiție între faza mobilă și faza staționară cu hidrocarburi. Eluția amestecurilor de substanțe se face în funcție de caracterul hidrofob, substanțele solubile în apă fiind eluate mai întâi și cele solubile în solvenți organici eluate ultimele, proporțional cu coeficientul lor de partiție hidrocarbură/apă. Aceasta face posibilă să fie stabilită relația dintre timpul de retenție pe o astfel de coloană (faza inversă) și coeficientul de partiție n-octanol/apă ce trebuie determinat. Coeficientul de partiție este dedus din *factorul de capacitate*  $k$ , dat de:



**▼B**

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

în care  $t_r$  = timpul de retenție al substanței de testat și  $t_0$  = timpul mediu necesar unei molecule de solvent pentru a trece prin coloană (timp mort).

Nu sunt necesare metode analitice cantitative, ci doar determinarea timpilor de eluție.

## 1.5. CRITERII DE CALITATE

### 1.5.1. Repetabilitatea

#### *Metoda agitării flaconului*

Pentru a asigura acuratețea măsurătorii coeficientului de partiție trebuie realizate determinări duble în trei condiții de testare diferite, prin care cantitatea de substanță utilizată, precum și raportul volumelor de solvent poate fi variat. Valorile determinate ale coeficientului de partiție exprimate logaritmice vor fi în intervalul  $\pm 0,3$  unități logaritmice.

#### *Metoda HPLC*

Pentru a crește coeficientul de încredere al măsurătorilor, trebuie să fie făcute determinări duble. Valorile pentru  $\log P$  derivate din măsurătorile individuale vor fi în intervalul  $\pm 0,1$  unități logaritmice.

### 1.5.2. Sensibilitate

#### *Metoda agitării flaconului*

Intervalul de aplicabilitate al metodei este determinat de limita de detectare a metodei analitice. Aceasta trebuie să permită evaluarea valorilor  $\log P_{ow}$  în intervalul de la  $-2$  la  $4$  (ocazional, când condițiile impun acest lucru, acest interval poate fi extins pentru  $\log P_{ow}$  până la  $5$ ) când concentrația solutului în oricare fază nu este mai mare de  $0,01$  mol pe litru.

#### *Metoda HPLC*

Metoda HPLC face posibilă estimarea coeficienților de partiție în intervalul  $0$  până la  $6$  pentru  $\log P_{ow}$ .

În mod normal, coeficientul de partiție al unui compus poate fi estimat cu o eroare de  $\pm 1$  unitate logaritmice față de valoarea determinată prin metoda agitării flaconului. Corelații tipice pot se găsi în literatura de specialitate (4) (5) (6) (7) (8). O mai mare acuratețe poate fi obținută în mod normal când graficele de corelare se bazează pe compuși de referință înrudiți structural (9).

**▼B****1.5.3. Specificitate***Metoda agitării flaconului*

Legea partiției a lui Nernst se aplică numai la temperatură, presiune și pH constante pentru soluții diluate. Ea se aplică strict unei substanțe pure dispersată între doi solvenți puri. Dacă sunt prezenți diferiți soluți în una sau în ambele faze în același timp, aceasta poate afecta rezultatele.

Disocierea sau asocierea moleculelor dizolvate duce la deviații de la legea partiției a lui Nernst. Astfel de deviații sunt indicate de funcția care descrie dependența coeficientului de partiție de concentrația soluției.

Întrucât presupune echilibre multiple, această metodă nu se folosește în cazul compușilor ionizabili fără a aplica o corecție. Pentru astfel de compuși se ia în considerare folosirea soluțiilor tampon în locul apei; pH-ul soluției tampon trebuie să difere cu cel puțin 1 unitate de pKa-ul substanței ținând seama și de semnificația acestui pH pentru mediu.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Estimarea preliminară a coeficientului de partiție**

Coeficientul de partiție este estimat de preferință prin calcul (a se vedea apendicele 1) sau, acolo unde este posibil, prin raportul solubilităților substanței testate în solvenți puri (10).

**1.6.2. Metoda agitării flaconului****1.6.2.1. Pregătire**

n-Octanol: Determinarea coeficientului de partiție va fi efectuată cu reactivi de puritate analitică ridicată.

Apă: se folosește apă distilată sau dublu distilată în aparate din sticlă sau cuarț. Dacă este cazul, pentru compușii ionizabili vor fi folosite în locul apei soluții tampon.

*Notă:*

Nu se folosește apa luată direct dintr-un aparat cu schimbători de ioni.

**1.6.2.1.1. Presaturarea solvenților**

Înainte de determinarea coeficientului de partiție, fazele sistemului de solvent sunt saturate reciproc prin agitare la temperatura de testare. În acest scop, de obicei se agită două sticle mari cu n-octanol de puritate analitică sau apă, fiecare cu o cantitate suficientă din celălalt solvent, timp de 24 de ore, cu un agitator mecanic, apoi se lasă suficient de mult timp pentru a permite fazelor să se separe și pentru a realiza o stare de saturație.

**▼B****1.6.2.1.2. Pregătirea testului**

Întregul volum al sistemului bifazic trebuie să umple aproape total vasul de testare. Aceasta va ajuta la prevenirea pierderilor de material datorită volatilizării. Raportul volumelor și cantitățile de substanță ce vor fi folosite sunt fixate prin următoarele condiții:

- evaluarea preliminară a coeficientului de partiție (a se vedea mai sus);
- cantitatea minimă din substanța de testat necesară la determinările analitice; și
- limita concentrației maxime în fiecare fază este de 0,01 mol pe litru.

Sunt efectuate 3 măsurători. În prima este folosit raportul de volume n-octanol/apă calculat; în a doua măsurătoare acest raport se împarte la 2; în a treia acest raport înmulțește cu 2 (de exemplu 1:1, 1:2, 2:1).

**1.6.2.1.3. Substanța de testat**

O soluție mamă este preparată în n-octanol presaturat cu apă. Concentrația acestei soluții mamă va fi determinată cu precizie înainte folosirii ei pentru stabili coeficientului de partiție. Această soluție va fi depozitată în condiții care să-i asigure stabilitatea.

**1.6.2.2. Condiții experimentale**

Temperatura de testare se menține constantă ( $\pm 1$  °C) și se află în intervalul 20-25 °C.

**1.6.2.3. Procedul de măsurare****1.6.2.3.1. Stabilirea echilibrului de partiție**

Pentru fiecare dintre condițiile de testare se pregătesc două vase de testare conținând cantitățile necesare, precis măsurate din cei doi solvenți, împreună cu cantitatea necesară din soluția mamă.

Fazele cu n-octanol vor fi măsurate volumetric. Vasele de testare sunt amplasate într-un agitator adecvat sau sunt agitate în mână. Când se folosește un tub de centrifugă, o metodă recomandată este aceea să se rotească acest tub repede într-o direcție aflată la 180° față de axa sa transversală, astfel încât aerul captat să se ridice prin cele două faze. Experiența a arătat că 50 de astfel de rotații sunt de regulă suficiente pentru stabilirea partiției de echilibru. Pentru siguranță se recomandă 100 de rotații în 5 minute.

**1.6.2.3.2. Separarea fazelor**

Dacă este necesar, se efectuează centrifugarea amestecului pentru a separa fazele. Acest lucru se desfășoară într-o centrifugă de laborator menținută la temperatura camerei sau, dacă este folosită o centrifugă neîncălzită, tuburile centrifugei se păstrează pentru echilibrare la temperatura de testare cel puțin o oră înainte de analiză.

**▼B**1.6.2.4. *Analiza*

Pentru determinarea coeficientului de partiție este necesară determinarea concentrațiilor de substanță analizată în ambele faze. Aceasta poate fi făcută prin prelevarea unei probe alicote din fiecare din cele două faze din fiecare tub pentru fiecare condiție de testare și analizarea lor prin metoda aleasă. Cantitatea totală de substanță prezentă în ambele faze se calculează și se compară cu cantitatea de substanță introdusă la început.

Faza apoasă este eșantionată printr-o operațiune care reduce la minim riscul includerii unor urme de n-octanol: o seringă de sticlă cu ac detașabil poate fi folosită pentru a lua probe din faza apoasă. Inițial, seringă se umple parțial cu aer. Aerul se elimină cu atenție în timp ce se introduce acul prin stratul de n-octanol. Un volum corespunzător din faza apoasă este tras în seringă. Seringă se scoate repede din soluție și acul se detașează. Conținutul seringii poate fi apoi folosit ca probă apoasă. Concentrația în cele două faze separate este determinată de preferință printr-o metodă specifică substanței. Exemple de metode analitice adecvate sunt:

— metode fotometrice;

— cromatografia cu gaz;

— cromatografia lichidă de înaltă performanță.

1.6.3. **Metoda HPLC**1.6.3.1. *Pregătire**Aparatură*

Este necesar un cromatograf de lichide la care s-a atașat o pompă fără pulsații și un instrument de detecție adecvat. Este recomandată folosirea unei valve de injecție cu bucle de injecție. Prezența grupelor polare în faza staționară poate diminua serios performanțele coloanei HPLC. Prin urmare, faza staționară va avea un procent minim de grupe polare (11). Pot fi folosite umpluturi de microparticule pentru inversarea fazelor sau coloane gata umplute. O coloană de gardă poate fi poziționată între sistemul de injecție și coloana analitică.

*Faza mobilă*

Pentru a prepara solventul de eluție se folosește metanol grad HPLC și apă de puritate HPLC; solventul este degazat înainte de folosire. Se folosește eluția izocratică. Se utilizează un raport metanol/apă cu un conținut minim de apă de 25 %. În general, un amestec metanol-apă 3:1 este satisfăcător pentru eluția compușilor cu log P 6 într-o oră, la un debit de 1 ml/minut. Pentru compuși cu log P mare poate fi necesar să se scurteze timpul de eluție (și cel al compușilor de referință) prin descreșterea polarității fazei mobile sau a lungimii coloanei.

Substanțele cu solubilitate foarte scăzută în n-octanol tind să dea valori neobișnuit de mici pentru log  $P_{ow}$  prin metoda HPLC; picurile unor astfel de compuși însoțesc uneori frontul de solvent. Aceasta se datorează probabil faptului că procesul de partiție este prea lent pentru a atinge echilibrul în timpul necesar în mod normal pentru o separare. Scăderea debitului și/sau micșorarea raportului metanol/apă poate fi o măsură eficientă pentru a ajunge la o valoare fiabilă.

**▼B**

Compușii de testare și compușii de referință trebuie să fie solubili în faza mobilă într-o concentrație suficientă pentru a permite detectarea lor. Numai în cazuri excepționale pot fi folosiți aditivi împreună cu amestecul metanol-apă, deoarece aditivii vor schimba proprietățile coloanei. Pentru cromatograme cu aditivi este obligatoriu să se folosească o coloană separată de același tip. Dacă amestecul metanol-apă nu este corespunzător, pot fi folosite alte amestecuri solvent organic-apă, de exemplu etanol-apă sau acetonitril-apă.

PH-ul eluentului este un factor critic pentru compușii ionizabili. Trebuie să fie în intervalul de pH al coloanei, care este de obicei cuprins între 2 și 8. Este recomandabilă tamponarea. Se evită atent precipitarea sărurilor și deteriorarea coloanei în cazul unor amestecuri fază organică-soluție tampon. Măsurătorile HPLC cu fază staționară de silicagel nu sunt recomandabile în cazul unui pH mai mare de 8 deoarece folosirea unei faze mobile alcaline poate cauza scăderea rapidă a performanțelor coloanei.

*Soluții*

Compușii de referință sunt cei mai puri disponibili. Dacă este posibil, compușii care sunt folosiți în scopuri de testare sau calibrare se dizolvă în faza mobilă.

*Condiții experimentale*

În timpul măsurătorilor, temperatura nu variază cu mai mult de  $\pm 2$  K.

**1.6.3.2. Măsurători***Calcularea timpului mort  $t_0$* 

Timpul mort  $t_0$  poate fi determinat prin folosirea unei serii omoloage (de exemplu n-alchil metil cetone) sau compuși organici care nu se absorb pe coloană (de exemplu tiourea sau formamida). Pentru calcularea timpului mort  $t_0$  prin folosirea unei serii omoloage, un set de cel puțin 7 membri ai seriei omoloage este injectat și sunt determinați timpii respectivi de retenție. Timpii retenției brute  $t_{r(nc+1)}$  sunt reprezentați ca funcție de  $t_{r(nc)}$  și sunt determinate constanta a și panta b a ecuației de regresie:

$$t_{r(nc+1)} = a + b t_{r(nc)}$$

(nc = numărul de atomi de carbon). Timpul mort  $t_0$  este dat de:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

**▼B***Graficul de calibrare*

Următorul pas este trasarea graficului de corelație între valorile lui  $\log k$  și  $\log P$  pentru compușii de referință. În practică, un set de 5 până la 10 compuși de referință standard al căror  $\log P$  se găsește în limitele intervalului preconizat se injectează simultan și se determină timpii de retenție, preferabil cu un înregistrator conectat la sistemul de detecție. Se calculează logaritmi corespunzători ai factorilor de capacitate,  $\log k$ , și se trasează graficul funcției  $\log P$  determinat prin metoda agitării flaconului. Calibrarea se execută la intervale egale, cel puțin o dată pe zi, așa încât să se poată ține seama de posibilele schimbări în performanțele coloanei.

*Determinarea factorului de capacitate al substanței de testat*

Proba este injectată într-o cantitate cât mai mică posibil de fază mobilă. Se determină timpul de retenție (în duplicat), permițând calcularea factorului de capacitate  $k$ . Din graficul de corelare al compușilor de referință poate fi interpolat coeficientul de partiție al substanței de testat. Pentru coeficienții de partiție foarte mici și pentru cei foarte mari, este necesară extrapolarea. În aceste cazuri particulare trebuie să se acorde atenție limitelor de încredere ale liniei de regresie.

**2. DATE***Metoda agitării flaconului*

Fiabilitatea valorilor determinate pentru  $P$  poate fi testată prin compararea valorilor medii rezultate la determinările duble cu media generală.

**3. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile exacte ale substanței (identitate și impurități);
- când metodele nu sunt aplicabile (de exemplu, pentru agenții tensioactivi) se prezintă o valoare calculată sau una estimată bazată pe solubilitățile individuale în *n*-octanol și apă;
- toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele referitoare la impurități și la starea fizică a substanței.

*Pentru metoda agitării flaconului:*

- rezultatul estimării preliminare, dacă există;
- temperatura la care s-au făcut determinările;
- date despre metodele analitice folosite pentru determinarea concentrațiilor;
- timpul și viteza de centrifugare, dacă a fost folosită;

**▼B**

- concentrațiile măsurate în ambele faze pentru fiecare determinare (aceasta înseamnă că se prezintă un total de 12 concentrații);
- masa substanței de testat, volumul fiecărei faze folosite în fiecare vas de testare și cantitatea totală calculată de substanță, prezentă în fiecare fază după atingerea echilibrului;
- valorile calculate ale coeficientului de partiție (P) și media lor se consemnează pentru fiecare set de condiții experimentale, ca și media pentru toate determinările. Dacă există vreun indiciu privind coeficientul de partiție în funcție de concentrație, aceasta este notată în raport;
- se consemnează deviația standard a valorilor individuale ale lui P de la media lor;
- media P a tuturor determinărilor se exprimă și ca logaritm (în baza 10);
- valoarea calculată teoretic pentru  $P_{ow}$  când această valoare a fost determinată sau când valoarea măsurată este  $> 10^4$ ;
- pH-ul apei folosite în timpul experimentului și al fazei apoase;
- dacă sunt folosite soluții tampon, justificarea pentru folosirea soluțiilor tampon în locul apei, compoziția, concentrația și pH-ul soluțiilor tampon, pH-ul fazei apoase, înainte și după experiment.

*Pentru metoda HPLC:*

- rezultatul estimării preliminare, dacă există;
- substanțele de referință și de testat și puritatea lor;
- intervalul de temperatură al determinărilor;
- pH-ul la care au fost făcute determinările;
- detalii despre coloana analitică și de gardă, faza mobilă și mijlocul de detecție;
- datele privind retenția și valorile log P din literatură pentru compușii de referință folosiți la calibrare;
- detalii despre dreapta de regresie calculată (log k în funcție de log P);
- datele de retenție medii și valoarea interpolată log P pentru compusul de testat;
- descrierea echipamentului și a condițiilor de operare;
- profilurile de eluție;
- cantitățile de substanță de testat și de referință introduse în coloană;
- timpul mort și cum a fost măsurat.

**▼B**4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
3. Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
4. L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, p. 683.
5. H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, p. 219 (1981).
6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, p. 73.
7. W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, p. 1.
8. J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, p. 675.
9. S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, p. 787.
10. O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, p. 223-339.
11. R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, p. 479.
12. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.
13. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
14. NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.
15. C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.
16. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.
17. C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 1207.
18. W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, p. 1113.
19. D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, p. 382.
20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.



**▼B**

21. R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.
22. Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.
23. N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, p. 615.



## Apendicele 1

### Metode de calcul/estimare

#### INTRODUCERE

O introducere generală în metodele de calcul, cu date și exemple este furnizată de Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Valorile calculate pentru  $P_{ow}$  pot fi folosite:

- pentru a decide care dintre metodele experimentale este adecvată (intervalul pentru metoda agitării flaconului:  $\log P_{ow}$ : - 2 până la 4, intervalul HPLC:  $\log P_{ow}$ : 0 până la 6);
- pentru selectarea condițiilor de testare adecvate (de exemplu, substanțe de referință pentru procedurile HPLC, raportul de volume n-octanol/apă pentru metoda agitării flaconului);
- ca verificare internă de laborator a posibilelor erori experimentale;
- pentru a furniza un  $P_{ow}$  estimat în cazul când metodele experimentale nu pot fi aplicate din motive tehnice.

#### METODA ESTIMATIVĂ

*Estimarea preliminară a coeficientului de partiție*

Valoarea coeficientului de partiție poate fi estimată prin folosirea solubilităților substanței de testat în solvenți puri. Astfel,

$$P_{\text{saturare}} = \frac{\text{saturare } c_n - \text{octanol}}{\text{saturare } c_{\text{apă}}}$$

#### METODE DE CALCUL

*Principiul metodelor de calcul*

Toate metodele de calcul se bazează pe fragmentarea formală a moleculei în structuri adecvate pentru care se cunosc creșteri fiabile ale valorilor  $\log P_{ow}$ . Log  $P_{ow}$  al întregii molecule este apoi calculat ca sumă a valorilor corespunzătoare fragmentelor plus suma termenilor de corecție pentru interacțiunile intramoleculare.

Listele constantelor fragmentelor și ale termenilor de corecție sunt disponibile în (b), (c), (d) și (e). Unele sunt actualizate cu regularitate (b).

#### Criterii de calitate

În general, fiabilitatea metodei de calcul scade odată cu creșterea complexității compusului studiat. În cazul moleculelor simple, cu masa moleculară scăzută și una sau două grupe funcționale, se preconizează abateri de la 0,1 până la 0,3 unități  $\log P_{ow}$  între rezultatele diferitelor metode de fragmentare și valoarea măsurată. În cazul moleculelor mai complexe, marja de eroare poate fi mai mare. Aceasta va depinde de fiabilitatea și disponibilitatea constantelor de fragmente, precum și de abilitatea analistului de a recunoaște interacțiuni intramoleculare (de exemplu legături de hidrogen) și de corecta folosire a factorilor de corecție (o problemă care apare mai puțin dacă se folosește programul CLOGP-3) (b). În cazul compușilor ionizabili este importantă atribuirea corectă a sarcinii sau a gradului de ionizare.

**▼B****Metode de calcul***Metoda  $\pi$  a lui Hansch*

Constanta substituentului hidrofob original,  $\pi$ , introdusă de Fujita *et al.* (f) se definește ca:

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

unde  $P_{ow}(\text{PhX})$  este coeficientul de partiție al unui derivat aromatic și  $P_{ow}(\text{PhH})$  este coeficientul de partiție al compusului inițial.

[de exemplu  $\pi_{\text{Cl}} = \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71$ ].

În concordanță cu definiția, metoda  $\pi$  este aplicabilă în special pentru substituenții aromatici, valorile  $\pi$  pentru un mare număr de substituenți fiind tabelate (b) (c) (d). Acestea sunt folosite pentru calcularea  $\log P_{ow}$  pentru molecule sau substructuri aromatice.

*Metoda Rekker*

Conform lui Rekker (g), valoarea pentru  $\log P_{ow}$  se calculează după cum urmează:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termeni de interacțiune})$$

unde  $f_i$  reprezintă constantele diferitelor fragmente moleculare și  $a_i$  frecvența apariției lor în molecula investigată. Termenii de corecție pot fi exprimați ca un multiplu întreg al unei singure constante  $C_m$  (așa numita „constantă magică”). Constantele de fragment  $f_i$  și  $C_m$  au fost determinate dintr-o listă de 1 054 valori experimentale pentru  $P_{ow}$  (825 de compuși), folosind analiza regresivă multiplă (c) (h). Determinarea termenilor de interacțiune este efectuată în concordanță cu regulile stabilite descrise în literatură (e) (h) (i).

*Metoda Leo-Hansch*

Potrivit lui Leo și Hansch (c), valoarea  $\log P_{ow}$  se calculează din:

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

unde  $f_i$  reprezintă constantele diferitelor fragmente moleculare,  $F_j$  termenii de corecție, iar  $a_i$ ,  $b_j$  frecvența fragmentului corespunzător. Din valorile experimentale  $P_{ow}$ , a fost determinată prin încercare și eroare o listă a valorilor pentru fragmentele atomice și de grup și o listă a termenilor de corecție  $F_j$  (așa numiți „factori”). Termenii de corecție au fost ordonați în diferite clase (a) (c). A lua în considerare toate regulile și termenii de corecție este relativ complicat și consumă timp. Pentru această metodă există câteva pachete de programe computerizate (b).

*Metoda combinată*

Calculul  $\log P_{ow}$  al moleculelor complexe poate fi considerabil îmbunătățit, dacă molecula este împărțită în substructuri mari, pentru care există valori  $\log P_{ow}$  fiabile fie din tabele (b) (c), fie din măsurătorile proprii. Astfel de fragmente (de exemplu heterocicluri, antrachinona, azobenzen) pot fi apoi combinate cu valorile  $\pi$  Hansch sau cu constantele fragmentelor Rekker sau Leo.

**Observații**

- (i) Metodele de calcul pot fi aplicate compușilor parțial sau total ionizați numai atunci când este posibil să se ia în considerare factorii de corecție necesari.

**▼B**

- (ii) Dacă se presupune că există legături de hidrogen intramoleculare, trebuie adăugați termenii de corecție corespunzători (aproximativ + 0,6 până la + 1,0 unități log  $P_{ow}$ ) (a). Indicații privind prezența unor astfel de legături pot fi obținute din modelele stereochemice sau din datele spectroscopice ale moleculei.
- (iii) Dacă sunt posibile diferite forme tautomere, structura cea mai probabilă va fi folosită ca bază de calcul.
- (iv) Edițiile revizuite ale listelor cu constantele fragmentelor se vor urmări atent.

**Raport de testare**

Când se folosesc metodele de calcul/estimare, raportul de testare cuprinde următoarele informații, dacă este posibil:

- descrierea substanței (amestec, impurități etc.);
- indicarea oricăror posibile legături de hidrogen intramoleculare, a disocierii, a sarcinii și a oricăror altor efecte neobișnuite (de exemplu tautomerie);
- descrierea metodei de calcul;
- identificarea sau anexarea bazei de date folosită;
- particularități în alegerea fragmentelor;
- documentația cuprinzătoare a calculului.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

- (a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- (b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.
- (e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.-Chill. Ther. 1979, vol. 14, p. 479.
- (f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, p. 5175.
- (g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.
- (h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.
- (i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.



## Apendicele 2

## Substanțele de referință recomandate pentru metoda HPLC

| Nr. crt. | Substanță de referință | log P <sub>ow</sub> | pKa                       |
|----------|------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1        | 2-butanonă             | 0,3                 |                           |
| 2        | 4-acetilpiridină       | 0,5                 |                           |
| 3        | anilină                | 0,9                 |                           |
| 4        | acetanilidă            | 1,0                 |                           |
| 5        | alcool benzilic        | 1,1                 |                           |
| 6        | p-metoxifenol          | 1,3                 | pKa = 10,26               |
| 7        | acid fenoxi acetic     | 1,4                 | pKa = 3,12                |
| 8        | fenol                  | 1,5                 | pKa = 9,92                |
| 9        | 2,4-dinitrofenol       | 1,5                 | pKa = 3,96                |
| 10       | benzonitril            | 1,6                 |                           |
| 11       | fenilacetonitril       | 1,6                 |                           |
| 12       | alcool 4-metilbenzilic | 1,6                 |                           |
| 13       | acetofenonă            | 1,7                 |                           |
| 14       | 2-nitrofenol           | 1,8                 | pKa = 7,17                |
| 15       | acid 3-nitrobenzoic    | 1,8                 | pKa = 3,47                |
| 16       | 4-cloranilină          | 1,8                 | pKa = 4,15                |
| 17       | nitrobenzen            | 1,9                 |                           |
| 18       | alcool cinamic         | 1,9                 |                           |
| 19       | acid benzoic           | 1,9                 | pKa = 4,19                |
| 20       | p-crezol               | 1,9                 | pKa = 10,17               |
| 21       | acid cinamic           | 2,1                 | pKa = 3,89 cis 4,44 trans |
| 22       | anisol                 | 2,1                 |                           |
| 23       | benzoat de metil       | 2,1                 |                           |
| 24       | benzen                 | 2,1                 |                           |
| 25       | acid 3- metilbenzoic   | 2,4                 | pKa = 4,27                |
| 26       | 4-clorofenol           | 2,4                 | pKa = 9,1                 |
| 27       | tricloretilenă         | 2,4                 |                           |
| 28       | atrazină               | 2,6                 |                           |
| 29       | benzoat de etil        | 2,6                 |                           |
| 30       | 2,6-diclorbenzonitril  | 2,6                 |                           |
| 31       | acid 3-clorbenzoic     | 2,7                 | pKa = 3,82                |
| 32       | toluen                 | 2,7                 |                           |
| 33       | 1- naftol              | 2,7                 | pKa = 9,34                |
| 34       | 2,3-dicloranilină      | 2,8                 |                           |
| 35       | clorbenzen             | 2,8                 |                           |
| 36       | alil-fenileter         | 2,9                 |                           |
| 37       | brombenzen             | 3,0                 |                           |

▼ B

| Nr. crt.   | Substanță de referință       | log P <sub>ow</sub> | pKa        |
|--|------------------------------|---------------------|------------|
| 38   | etilbenzen                   | 3,2                 |            |
| 39   | benzofenonă                  | 3,2                 |            |
| 40   | 4-fenilfenol                 | 3,2                 | pKa = 9,54 |
| 41   | timol                        | 3,3                 |            |
| 42   | 1,4-diclorbenzen             | 3,4                 |            |
| 43   | difenilamină                 | 3,4                 | pKa = 0,79 |
| 44   | naftalină                    | 3,6                 |            |
| 45   | fenilbenzoat                 | 3,6                 |            |
| 46   | izopropilbenzen              | 3,7                 |            |
| 47   | 2,4,6-triclorfenol           | 3,7                 | pKa = 6    |
| 48   | bifenil                      | 4,0                 |            |
| 49   | benzilbenzoat                | 4,0                 |            |
| 50   | 2,4-dinitro-6 sec-butilfenol | 4,1                 |            |
| 51   | 1,2,4-triclorbenzen          | 4,2                 |            |
| 52   | acid dodecanoic              | 4,2                 |            |
| 53   | difenileter                  | 4,2                 |            |
| 54   | n- butilbenzen               | 4,5                 |            |
| 55   | fenantren                    | 4,5                 |            |
| 56   | fluoranten                   | 4,7                 |            |
| 57   | dibenzil                     | 4,8                 |            |
| 58   | 2,6-difenil-piridină         | 4,9                 |            |
| 59   | trifenilamină                | 5,7                 |            |
| 60   | DDT                          | 6,2                 |            |
| Alte substanțe de referință cu log P <sub>ow</sub> mic |                              |                     |            |
| 1  | acid nicotinic               | - 0,07              |            |

**▼B****A.9. PUNCTUL DE INFLAMABILITATE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Pentru efectuarea acestui test, este util să se colecteze informații preliminare despre inflamabilitatea substanței. Modul de operare este aplicabil substanțelor lichide ai căror vapori se pot aprinde în prezența unei surse de aprindere. Metodele de testare prezentate în acest text sunt fiabile numai pentru intervalele de puncte de inflamabilitate specificate pentru fiecare metodă în parte.

La alegerea metodei ce urmează să fie folosită se va lua în considerare posibilitatea apariției unor reacții chimice între substanță și suportul probei.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Punctul de inflamabilitate este cea mai joasă temperatură, corectată la presiunea de 101,325 kPa, la care lichidul degajă vapori, în condițiile specifice ale metodei de analiză, într-o asemenea cantitate încât în vasul de testare se produce un amestec inflamabil vapori/aer.

Unități: °C

$$t = T - 273,15$$

(t în °C și T în K)

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Substanța se introduce în vasul de testare și este încălzită sau răcită până la temperatura de testare conform procedurii specifice metodei de testare. Încercările de aprindere sunt efectuate pentru a dovedi dacă eșantionul se aprinde sau nu la temperatura de testare.

**1.5. CRITERII DE CALITATE****1.5.1. Repetabilitate**

Repetabilitatea variază în funcție de intervalul punctului de inflamabilitate și de metoda folosită; maximum 2 °C.

**1.5.2. Sensibilitate**

Sensibilitatea depinde de metoda de testare folosită.

**1.5.3. Specificitate**

Specificitatea unora dintre metode este limitată la anumite intervale de puncte de inflamabilitate și depinde de caracteristicile substanței (de exemplu, viscozitate mare).

**▼B**

## 1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Pregătiri**

O probă de substanță se introduce într-un aparat de testare în conformitate cu punctul 1.6.3.1 și/sau 1.6.3.2.

Pentru siguranță se recomandă ca pentru substanțele reactive sau toxice să fie folosită o metodă care utilizează o cantitate mică de probă, circa 2 cm<sup>3</sup>.

1.6.2. **Condiții experimentale**

Aparatul se așează într-o poziție fără curenți de aer, în conformitate cu normele de siguranță.

1.6.3. **Desfășurarea testului**1.6.3.1. *Metoda echilibrului*

A se vedea ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Metoda non-echilibrului*

*Aparatul Abel:*

A se vedea BS 2000 partea 170, NF M07-011, NF T66-009.

*Aparatul Abel-Pensky:*

A se vedea EN 57, DIN 51755 partea 1 (pentru temperaturi de la 5° la 65 °C), DIN 51755 partea 2 (pentru temperaturi sub 5 °C), NF M07-036.

*Aparatul Tag:*

A se vedea ASTM D 56.

*Aparatul Pensky-Martens:*

A se vedea ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

*Observații:*

Când punctul de inflamabilitate, determinat printr-o metodă de non-echilibru în conformitate cu punctul 1.6.3.2, are valori de  $0 \pm 2$  °C,  $21 \pm 2$  °C sau  $55 \pm 2$  °C, acest lucru se confirmă printr-o metodă de echilibru, folosindu-se același aparat.

Numai metodele prin care se poate determina temperatura de inflamabilitate pot fi folosite pentru notificări.

Pentru a determina punctul de inflamabilitate al lichidelor vâscoase (vopsele, rășini și altele similare) care conțin solvenți, pot fi folosite numai aparate și metode potrivite pentru determinarea punctului de inflamabilitate al lichidelor vâscoase.

A se vedea ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 partea 1.



**▼B**2. **DATE**3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);
- o descriere a metodei folosite, precum și orice posibile abateri;
- rezultatele și orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Niciuna.

**▼B****A.10. INFLAMABILITATE (SOLIDE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Înainte de efectuarea testului este util să se colecteze informații preliminare asupra posibilelor proprietăți explozive ale substanței.

Acest test se aplică numai substanțelor sub formă de pulbere, granule sau pastă.

Pentru a nu include toate substanțele care se pot aprinde, ci numai acelea care ard rapid sau acelea al căror comportament la ardere este periculos în orice mod, se consideră că sunt foarte inflamabile numai substanțele a căror viteză de ardere depășește o anumită valoare-limită.

Poate fi deosebit de periculos dacă incandescența se propagă printr-o pulbere metalică din cauza dificultăților în stingerea focului. Pulberile metalice vor fi considerate foarte inflamabile dacă întrețin propagarea incandescenței în toată masa într-un interval de timp definit.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Timpul de ardere este exprimat în secunde.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu sunt menționate.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Substanța este dispusă sub forma unei benzi continue sau a unui amestec de pulbere explozivă de aproximativ 250 mm lungime și este efectuat un test preliminar pentru a stabili dacă are loc, prin aprindere cu o flacără de gaz, propagarea prin ardere cu flacără sau mocnit. Dacă propagarea de-a lungul a 200 mm de amestec are loc într-un interval de timp specificat, atunci se efectuează un program complet de testare pentru a determina viteza de ardere.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Nu sunt menționate.

**▼B****1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Testul preliminar**

Substanța este dispusă sub forma unui cartuș compact sau a unui amestec de pulbere explozivă de aproximativ 250 mm lungime, 20 mm lățime, 10 mm înălțime, pe o placă de bază necombustibilă, neporoasă și care nu conduce bine căldura. O flacără de la un arzător cu gaz (minimum 5 mm diametru) este aplicată la unul din capetele amestecului de pulbere explozivă până când pulberea se aprinde sau timp de maximum 2 minute (5 minute pentru pulberi metalice sau de aliaje metalice). Se observă dacă de-a lungul celor 200 mm de amestec combustia se propagă în perioada de testare de 4 minute (sau 40 de minute pentru pulberile de metal). Dacă substanța nu se aprinde și combustia nu se propagă, nici prin ardere cu flacără, nici prin ardere mocnită, de-a lungul celor 200 mm de amestec de pulbere explozivă în perioada de testare de 4 minute (sau 40 minute), atunci substanța nu este considerată foarte inflamabilă și nu este necesară o altă testare. Dacă substanța propagă arderea de-a lungul a 200 mm lungime de amestec de pulbere explozivă în mai puțin de 4 minute, sau mai puțin de 40 de minute pentru pulberile metalice, atunci se urmează metoda descrisă mai jos (punctul 1.6.2 și următoarele).

**1.6.2. Testarea vitezei de ardere****1.6.2.1. Pregătire**

Substanțele granulare sau pulberile sunt introduse lejer într-o matriță de 250 mm lungime cu secțiune transversală triunghiulară cu înălțime interioară de 10 mm și lățime de 20 mm. Pe ambele fețe ale matriței, pe direcție longitudinală, se montează două plăci metalice ca opritoare laterale care depășesc cu 2 mm extremitatea superioară a secțiunii transversale triunghiulare (figura). Apoi se lasă matrița să cadă de trei ori de la o înălțime de 2 cm pe o suprafață solidă. Dacă este necesar, forma este apoi umplută din nou. Substanța în exces care rămâne se curăță cu o racletă oblică. Plăcile opritoare se scot și substanța rămasă este îndepărtată cu o racletă. Se pune deasupra matriței o placă de bază necombustibilă, neporoasă și slab conducătoare de căldură, ansamblul este răsturnat și se scoate forma.

Substanțele sub formă de pastă sunt întinse pe o placă necombustibilă, neporoasă și slab conducătoare de căldură sub forma unei fâșii de 250 mm lungime cu o secțiune transversală de aproximativ 1 cm.

**1.6.2.2. Condiții experimentale**

În cazul substanțelor sensibile la umezeală, testul va fi efectuat cât mai repede posibil după scoaterea din recipient.

**1.6.2.3. Desfășurarea testului**

Se pune eșantionul perpendicular pe curentul de aer din nișa de tiraj.

Viteza aerului trebuie să fie suficientă pentru a preveni degajarea vaporilor în laborator și să nu varieze în timpul testului. Curentul de aer trebuie să formeze un ecran în jurul aparatului.

O flacără fierbinte de la un arzător cu gaz (minimum 5 mm diametru) este folosită pentru a aprinde substanța în formă de cartuș, la o margine. Când cartușul a ars pe o distanță de 80 mm se măsoară viteza de ardere de-a lungul următorilor 100 de mm.

**▼B**

Testul se efectuează de 6 ori, folosind de fiecare dată o placă rece, curată, afară de cazul când este observat mai devreme un rezultat pozitiv.

2. **DATE**

Timpul de ardere din testul preliminar (1.6.1) și cel mai scurt timp de ardere din cele 6 teste (1.6.2.3) sunt relevante pentru evaluare.

3. **RAPORT**

3.1. **RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);
- o descriere a substanței de testat, starea sa fizică, inclusiv conținutul de umezeală;
- rezultatele testului preliminar de triere și ale testului vitezei de ardere, dacă au fost efectuate;
- toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

3.2. **INTERPRETAREA REZULTATELOR**

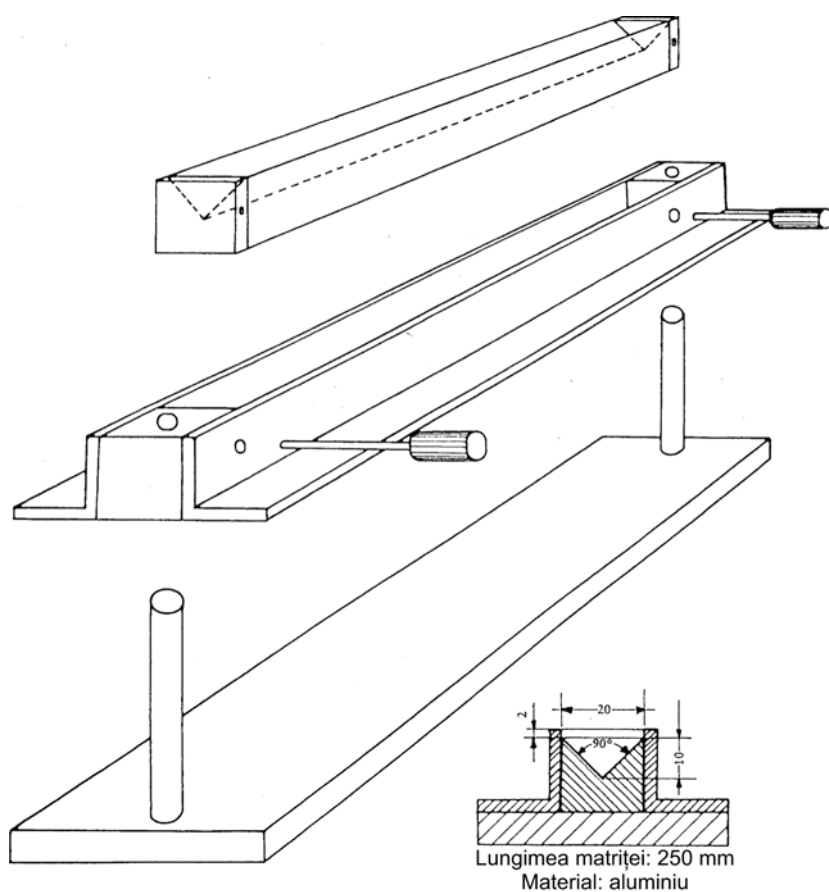
Substanțele sub formă de pulbere, pastă sau granulare se consideră foarte inflamabile dacă timpul de ardere dintr-unul din testele efectuate conform metodei de testare descrise la 1.6.2. este mai mic de 45 de secunde. Pulberile metalice sau de aliaje metalice sunt considerate foarte inflamabile dacă pot fi aprinse și flacăra sau zona de reacție se întinde asupra întregului eșantion în 10 minute sau mai puțin.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

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

**▼B***Apendice**Figură***Matrița și accesoriile pentru eșantionul în formă de cartuș**

(Toate dimensiunile în milimetri)



**▼B****A.11. INFLAMABILITATE (GAZE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Prin această metodă se determină dacă amestecurile de gaze cu aer, la temperatura camerei (circa 20 °C) și presiune atmosferică, sunt inflamabile și, în acest caz, în ce interval de concentrații. Amestecurile cu aer ale gazului testat, în concentrații crescânde, sunt expuse unei scânteii electrice și se observă dacă are loc aprinderea.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Intervalul de inflamabilitate este intervalul de concentrație dintre limita de explozie inferioară și cea superioară. Limitele de explozie inferioară și superioară sunt acele limite de concentrație ale gazului inflamabil în aer la care propagarea flăcării nu are loc.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu sunt menționate.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Concentrația gazului în aer se crește treptat și în fiecare etapă amestecul se expune la scânteie electrică.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Nu sunt menționate.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Aparatură**

Vasul de testare este un cilindru de sticlă vertical cu un diametru interior de minimum 50 mm și o înălțime de minimum 300 de mm. Electrozii de aprindere sunt separați de o distanță de 3 până la 5 mm și sunt plasați la 60 mm deasupra fundului cilindrului. Cilindrul este prevăzut cu o supapă de descărcare a presiunii. Aparatul trebuie să fie protejat pentru a limita posibilele efecte ale exploziei.

Ca sursă de aprindere este folosită o scânteie cu o durată de 0,5 secunde, generată de un transformator de înaltă tensiune cu o tensiune de ieșire de 10-15 kV (maximum de putere consumată 300 W). Un exemplu de aparat adecvat este descris în referința bibliografică 2.

**1.6.2. Condiții experimentale**

Testul trebuie efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C).

**▼B****1.6.3. Desfășurarea testului**

Folosind o pompă dozatoare, un amestec cu concentrație cunoscută de gaz în aer este introdus în cilindrul de sticlă. Prin amestec se trece o scânteie și se observă dacă flacăra se detașează de sursa de aprindere și se propagă independent. Concentrația gazului este mărită în pași de 1 % din volum până când are loc aprinderea conform descrierii de mai sus.

Dacă structura chimică a gazului indică faptul că acesta nu este inflamabil și poate fi calculată compoziția amestecului stoechiometric cu aerul, atunci este necesar să se testeze numai amestecuri din intervalul de la 10 % sub concentrația stoechiometrică până la 10 % peste această concentrație, în pași de 1 %.

**2. DATE**

Propagarea flăcării este singura informație relevantă pentru determinarea acestei proprietăți.

**3. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);
- o descriere, cu dimensiuni, a aparatului utilizat;
- temperatura la care a fost efectuat testul;
- concentrațiile testate și rezultatele obținute;
- rezultatul testului: gaz neinflamabil sau gaz foarte inflamabil;
- dacă se ajunge la concluzia că gazul nu este inflamabil, se va specifica intervalul de concentrație în care a fost testat în pași de 1 %;
- toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor trebuie raportate.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. NF T 20-041 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grever, H. Grosse-einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 156, 2, p. 126-127. Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. 'Entwicklung

**▼B****A.12. INFLAMABILITATE (CONTACTUL CU APA)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Metoda poate fi folosită pentru a stabili dacă reacția substanței cu apa sau cu umezeala din aer conduce la degajarea unor cantități periculoase de gaz sau gaze foarte inflamabile.

Metoda poate fi aplicată atât substanțelor solide, cât și celor lichide. Această metodă nu este aplicabilă substanțelor care se aprind în mod spontan în contact cu aerul.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Foarte inflamabil: o substanță care în contact cu apa sau aerul umed degajă gaze foarte inflamabile în cantități periculoase la un debit minim de 1 litru/kg pe oră.

**1.3. PRINCIPUL METODEI**

Substanța este testată în concordanță cu succesiunea de pași descrisă mai jos; dacă are loc aprinderea la unul din pași, nu mai este necesară testarea în continuare. Dacă se știe că substanța nu reacționează violent cu apa atunci se va trece direct la pasul 4 (punctul 1.3.4).

**1.3.1. Pasul 1**

Proba se introduce într-un jgheab care conține apă distilată la 20 °C și se notează dacă gazul dezvoltat se aprinde.

**1.3.2. Pasul 2**

Substanța este plasată pe o hârtie de filtru care plutește la suprafața apei distilate dintr-o capsulă de laborator, la 20 °C, și se observă dacă gazul dezvoltat se aprinde. Hârtia de filtru are rolul numai de a ține substanța într-un loc, pentru a crește șansa de aprindere.

**1.3.3. Pasul 3**

Eșantionul este prelucrat sub forma unui cartuș de aproximativ 2 cm înălțime și 3 cm diametru. Se adaugă câteva picături de apă și se notează dacă gazul dezvoltat se aprinde.

**1.3.4. Pasul 4**

Eșantionul este amestecat cu apă distilată la 20 °C și este măsurată viteza de degajare a gazului în timpul unei perioade de 7 ore, la intervale de 1 oră. Dacă viteza de degajare este inegală, sau este crescătoare, după 7 ore, timpul de măsurare poate fi extins la un timp maxim de 5 zile. Testul poate fi oprit dacă viteza la un moment dat depășește 1 l/kg/h.



**▼B**

## 1.4. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt menționate.

## 1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu sunt menționate.

## 1.6. DESCRIEREA METODELOR

1.6.1. **Pasul 1**1.6.1.1. *Condiții experimentale*

Testul este efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.1.2. *Desfășurarea testului*

O cantitate mică (aproximativ 2 mm diametru) din eșantion se introduce într-un jgheab cu apă distilată. Se notează dacă (i) se dezvoltă vreun gaz și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

1.6.2. **Pasul 2**1.6.2.1. *Aparatură*

O hârtie de filtru este făcută să plutească pe suprafața plană de apă distilată într-un vas potrivit, de exemplu o sticlă de ceas cu 100 mm diametru.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

Testul se efectuează la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.2.3. *Desfășurarea testului*

O cantitate mică (aproximativ 2 mm diametru) din eșantion se introduce în centrul unei hârtii de filtru. Se va nota dacă (i) apar gaze și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

1.6.3. **Pasul 3**1.6.3.1. *Condițiile experimentale*

Testul se efectuează la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.3.2. *Desfășurarea testului*

Eșantionul este prelucrat sub forma unui cartuș de aproximativ 2 cm înălțime și 3 cm diametru și cu o scobitură la vârf. Câteva picături de apă sunt adăugate în scobitură și se notează dacă (i) apar gaze și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

**▼B****1.6.4. Pasul 4****1.6.4.1. Aparatură**

Instalația este descrisă în figură.

**1.6.4.2. Condițiile experimentale**

Se examinează containerul cu eșantion pentru a observa dacă există pulberi < 500 μm (dimensiunea particulei). Dacă pulberea reprezintă mai mult de 1 % g/g din total sau dacă eșantionul este friabil, atunci toată substanța va fi mojarată până la pulbere înainte de testare pentru a permite reducerea dimensiunilor particulelor în timpul depozitării și manipulării; în caz contrar, substanța va fi testată așa cum a fost primită. Testul va fi efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C) și la presiune atmosferică.

**1.6.4.3. Desfășurarea testului**

10-20 ml de apă se pun în pâlnia de picurare a aparatului și 10 grame din substanță se introduc în paharul conic. Volumul de gaz degajat poate fi măsurat prin orice mijloc corespunzător. Se deschide robinetul pâlniei de picurare pentru a lăsa apa să treacă în paharul conic și se pornește cronometrul. Degajarea gazului este măsurată la intervale de o oră de-a lungul unei perioade de 7 ore. Dacă în timpul acestei perioade degajarea gazului este inegală sau dacă la sfârșitul acestei perioade viteza de degajare a gazului este în creștere, atunci măsurătorile vor fi continuate timp de cel mult 5 zile. Dacă la un moment dat în timpul măsurărilor viteza de degajare a gazului depășește 1 l/kg/oră, testul poate fi întrerupt. Testul se efectuează de 3 ori.

Dacă identitatea chimică a gazului este necunoscută, gazul se analizează. Atunci când gazul conține componenți foarte inflamabili și nu se cunoaște dacă amestecul este foarte inflamabil, trebuie preparat un amestec cu aceeași compoziție și testat conform metodei A.11.

**2. DATE**

Substanța este considerată periculoasă dacă:

— are loc o aprindere spontană în oricare din etapele metodei de testare;

sau

— există o degajare de gaz inflamabil cu o viteză mai mare de 1 l/kg de substanță pe oră.

**3. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— detalii despre prepararea inițială a substanței;

**▼B**

- rezultatele testelor (pașii 1, 2, 3 și 4);
- identitatea chimică a gazului degajat;
- viteza de degajare a gazului, dacă s-a efectuat pasul 4 (punctul 1.6.4);
- orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

**4.****REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

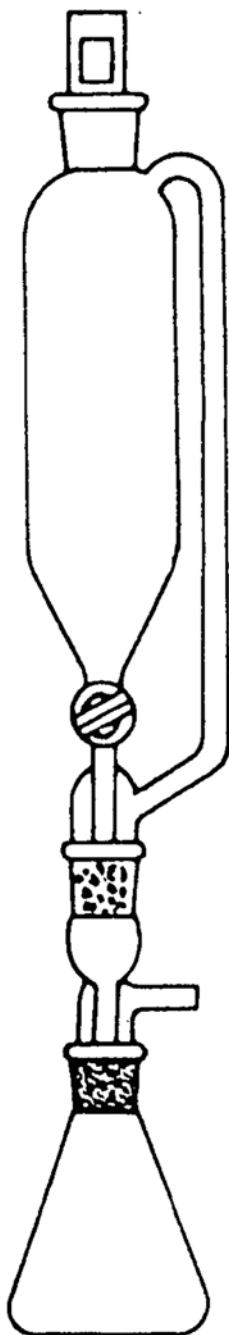
1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

*Apendice*

*Figura*

**Aparat**



**▼B****A.13. PROPRIETĂȚI PIROFORICE ALE SOLIDELOR ȘI ALE LICHIDELOR****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Procedura este aplicabilă substanțelor solide sau lichide care, în cantități mici, se aprind spontan la scurt timp după ce intră în contact cu aerul la temperatura camerei (circa 20 °C).

Această metodă de testare nu reglementează substanțele care necesită expunere la aer ore sau zile la temperatura camerei sau cele la care se produce aprinderea la temperaturi ridicate.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Substanțele sunt considerate ca având proprietăți piroforice dacă se aprind sau se carbonizează în condițiile descrise la punctul 1.6.

Autoaprinderea lichidelor poate fi, de asemenea, testată folosind metoda A.15 Temperatura de autoaprindere (lichide și gaze).

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu sunt menționate.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Substanța, solidă sau lichidă, este depusă pe un suport inert și adusă în contact cu aerul la temperatura ambiantă timp de 5 minute. Dacă substanțele lichide nu se aprind, sunt absorbite pe o hârtie de filtru și expuse la aer la temperatura ambiantă (circa 20 °C) pentru 5 minute. Dacă o substanță lichidă ori solidă se aprinde sau dacă o substanță lichidă aprinde sau carbonizează hârtia de filtru, atunci acea substanță este considerată a fi piroforică.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Repetabilitatea: din motive de siguranță, un singur rezultat pozitiv este suficient pentru ca substanța să fie considerată piroforică.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Aparatură**

O capsulă de porțelan de cca. 10 cm diametru se umple cu pământ de diatomee până la o înălțime de aproximativ 5 mm, la temperatura camerei (circa 20 °C).

Notă:

Pământul de diatomee sau o altă substanță inertă comparabilă care este disponibilă în mod uzual este considerat ca reprezentativ pentru solul pe care proba poate fi răsturnată în caz de accident.

Pentru testarea lichidelor care nu se aprind în contact cu aerul este necesară o hârtie de filtru uscată atunci când intră în contact cu un agent purtător inert.

**▼B****1.6.2. Desfășurarea testului****(a) Solide sub formă de pulbere**

Se toarnă 1-2 cm<sup>3</sup> de pulbere de substanță de la circa 1 m înălțime pe o suprafață necombustibilă și se observă dacă substanța se aprinde în timpul turnării sau în 5 minute de la depunere.

Testul este efectuat de 6 ori dacă nu are loc aprinderea.

**(b) Lichide**

Se toarnă aproximativ circa 5 cm<sup>3</sup> de lichid într-o capsulă de porțelan și se observă dacă substanța se aprinde în interval de 5 minute.

Dacă nu are loc nicio aprindere în 6 testări, se vor efectua următoarele teste:

Un eșantion de 0,5 ml este împins dintr-o seringă pe o hârtie de filtru pliată și se observă dacă are loc aprinderea sau carbonizarea hârtiei de filtru în 5 minute de la adăugarea lichidului. Testul este efectuat de 3 ori dacă nu are loc aprinderea sau carbonizarea.

**2. DATE****2.1. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Testarea poate fi întreruptă atunci când apare un rezultat pozitiv într-unul din teste.

**2.2. EVALUARE**

Dacă substanța se aprinde în 5 minute de la adăugarea ei la un purtător inert și expunerea la aer sau o substanță lichidă carbonizează sau aprinde o hârtie de filtru în 5 minute de când a fost adăugată și expusă la aer, este considerată a fi piroforică.

**3. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);
- rezultatele testelor;
- orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.
2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.



#### A.14. PROPRIETĂȚI EXPLOZIVE

##### 1. METODĂ

###### 1.1. INTRODUCERE

Prezenta metodă permite determinarea probabilității ca o substanță solidă sau sub formă de pastă să prezinte pericol de explozie atunci când este supusă la efectul unei flăcări (sensibilitate termică), la șoc mecanic sau la frecare (sensibilitate la stimuli mecanici) sau ca o substanță lichidă să prezinte pericol de explozie atunci când este supusă la efectul unei flăcări sau la șoc.

Metoda cuprinde trei părți:

- (a) un test de sensibilitate termică (1);
- (b) un test de sensibilitate mecanică la șoc (1);
- (c) un test de sensibilitate mecanică la frecare (1).

Metoda oferă date care permit evaluarea probabilității de a amorsa o explozie cu ajutorul unor stimuli obișnuiți. Scopul ei nu este să determine dacă o substanță sau un preparat este sau nu este susceptibil de a exploda în orice condiții.

Metoda este în măsură să determine dacă o substanță sau un preparat va prezenta pericol de explozie (sensibilitate termică sau mecanică) în condițiile speciale definite în directivă. Metoda se bazează pe mai multe tipuri de aparate, folosite pe scară largă pe plan internațional (1) și care au, în general, rezultate edificatoare. Se admite totuși că metoda nu este definitivă. Se pot folosi aparate alternative, cu condiția ca acestea să fie recunoscute pe plan internațional și ca rezultatele să poată fi corelate în mod adecvat cu cele obținute pe aparatul specificat.

Testele nu se justifică dacă datele termodinamice disponibile (căldura de formare, căldura de descompunere) și absența anumitor grupe reactive (2) în formula structurală permit să se stabilească în mod cert că substanța sau preparatul nu este susceptibil de a se descompune rapid cu degajare de gaze sau de căldură (altfel spus, materialul nu prezintă riscuri de explozie). Pentru lichide nu este necesar testul de sensibilitate mecanică la frecare.

###### 1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Exploziv:

Substanțe care sunt susceptibile de a exploda sub efectul flăcării sau sunt sensibile la șoc ori frecare în aparatul specificat (sau sunt mai sensibile din punct de vedere mecanic decât 1,3-dinitrobenzenul într-un aparat alternativ).

###### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

1,3-dinitrobenzen, în stare cristalină, de puritate tehnică, cernut să treacă prin sita cu ochiuri de 0,5 mm, pentru metodele de testare prin frecare și prin șoc.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX, hexogen, ciclonit – CAS 121-82-4), recristalizată din soluție apoasă de ciclohexanonă, cernută în stare umedă prin sită cu ochiuri de 250 μm și reținută pe sită cu ochiuri de 150 μm și apoi uscată la 103 ± 2 °C (timp de 4 ore) pentru o a doua serie de teste de sensibilitate mecanică (la șoc și frecare).

**▼B****1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Sunt necesare teste preliminare pentru a determina condițiile de siguranță în care se desfășoară cele trei teste de sensibilitate.

**1.4.1. Teste pentru determinarea siguranței în manipulare (3)**

Din motive de siguranță, înainte de realizarea testelor principale, se supun eșantioane foarte mici (cca. 10 mg.) de substanță la încălzire în aer liber cu flacără de arzător cu gaz, la șoc, în orice formă adecvată de aparat, și la frecare, folosind un ciocan de lemn și o nicovală, sau orice alt dispozitiv de frecare. Obiectivul constă în a determina dacă substanța este suficient de sensibilă și explozibilă încât realizarea testelor de sensibilitate prescrise, în special cel de sensibilitate termică, să necesite precauții speciale pentru a evita vătămarea operatorului.

**1.4.2. Sensibilitatea termică**

Metoda constă în încălzirea substanței într-un tub din oțel, închis cu plăci cu orificii de diametre diferite, pentru a determina dacă substanța este susceptibilă de a exploda în condiții de încălzire intensă și spațiu limitat într-un mod definit.

**1.4.3. Sensibilitatea mecanică (la șoc)**

Metoda constă în supunerea substanței la șocul produs de un corp cu masă specificată care cade de la o înălțime specificată.

**1.4.4. Sensibilitatea mecanică (la frecare)**

Metoda constă în supunerea unei substanțe, aflată în stare solidă sau sub formă de pastă, la frecare între suprafețe standardizate, în condiții specificate de forță și deplasare relativă.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Nu sunt menționate.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Sensibilitatea termică (efectul flăcării)****1.6.1.1. Aparatură**

Aparatura este constituită dintr-un tub din oțel, de unică folosință, cu dispozitive de închidere re folosibile (figura 1), instalat într-un dispozitiv de încălzire și protecție. Fiecare tub este obținut prin ambutisarea adâncă a tablei de oțel (a se vedea apendicele) și are un diametru interior de 24 mm, o lungime de 75 mm și o grosime a pereților de 0,5 mm. Tuburile sunt prevăzute cu flanșă la extremitatea deschisă, pentru a permite închiderea fiecăruia cu setul plăcii cu orificii. Acesta este constituit dintr-o placă cu rezistență la presiune, cu un orificiu central, montată strâns pe tub printr-o îmbinare cu șurub din două părți (piuliță și o șaibă filetată). Piulița și șaiba filetată sunt realizate din oțel crom-mangan (a se vedea apendicele) care nu produce scântei până la 800 °C. Plăcile perforate au o grosime de 6 mm, sunt realizate din oțel termorezistent (a se vedea apendicele) și sunt disponibile într-o gamă de diametre și orificii.



## ▼B

1.6.1.2. *Condiții experimentale*

În general, substanța este supusă testului în forma în care este primită, deși în anumite cazuri, de exemplu dacă este presată, turnată sau condensată într-un mod anume, s-ar putea să fie necesară mărunțirea acesteia înaintea testului.

Pentru substanțele solide, masa materialului ce urmează să fie supus testelor se determină printr-o metodă, în două etape, a probei în gol. Un tub căruia i s-a determinat țara este umplut cu 9 cm<sup>3</sup> de substanță și aceasta este tasată cu o forță de 80 N aplicată pe toată secțiunea transversală a tubului. Din motive de siguranță sau în cazurile în care este posibilă modificarea formei fizice a eșantionului prin compresie, se pot folosi alte procedee de umplere; de exemplu, dacă substanța este foarte sensibilă la frecare, nu se recomandă tasarea. Dacă substanța se poate comprima, atunci se mai adaugă și se tasează până la umplerea tubului pe o lungime de 55 mm de la capăt. Se determină masa totală a substanței folosite la umplerea tubului până la 55 mm și se mai adaugă substanță în două reprize, tasându-se de fiecare dată cu o forță de 80 N. Apoi se mai adaugă și se tasează sau se scoate material, astfel încât tubul să fie umplut pe o lungime de 15 mm de la partea superioară. Se execută a doua operație preliminară a probei în gol, plecând de la o cantitate tasată egală cu o treime din masa totală rezultată în prima etapă a probei gol. Se mai adaugă substanță în două reprize și se tasează cu o forță de 80 N reglându-se nivelul substanței din tub până la 15 mm de la partea superioară prin adăugare sau scoatere de substanță, după caz. Cantitatea de substanță solidă determinată în a doua operație preliminară se utilizează pentru fiecare test; umplerea fiind realizată în trei reprize, cu cantități egale, fiecare comprimată până la 9 cm<sup>3</sup> cu forța necesară, oricare ar fi valoarea acesteia. (Această operație poate fi facilitată prin folosirea unor inele de distanțare.)

Lichidele și gelurile se încarcă în tub până la o înălțime de 60 mm, având grijă în mod deosebit să se evite formarea bulelor în gel. Șaiba filetată este glisată pe tub dinspre bază, se inserează placa perforată corespunzătoare și se strânge piulița după aplicare unui lubrifiant pe bază de disulfură de molibden. Este esențial să se verifice dacă nu a rămas substanță prinsă între flanșă și placă sau în filet.

Încălzirea se realizează cu propan dintr-o butelie industrială, prevăzută cu un regulator de presiune (60-70 mbar), care trece printr-un contor de gaze și este distribuit uniform (în funcție de flacăra arzătoarelor) dintr-un rezervor către patru arzătoare. Arzătoarele sunt distribuite în jurul incintei de testare, așa cum se arată în figura 1. Cele patru arzătoare au un consum combinat de aproximativ 3,2 litri de propan pe minut. Se pot utiliza și alte gaze, respectiv arzătoare, dar viteza de încălzire trebuie să fie cea menționată în figura 3. Pentru toate aparatele, viteza de încălzire trebuie să se verifice periodic cu ajutorul tuburilor umplute cu dibutilftalat, după cum se indică în figura 3.

1.6.1.3. *Desfășurarea testelor*

Fiecare test se realizează până la fragmentarea tubului sau după încălzirea tubului timp de cinci minute. Dacă la test se produce fragmentarea tubului în trei sau mai multe bucăți, care uneori pot să fie legate între ele prin fâșii înguste de metal ca în figura 2, se estimează că s-a produs o explozie. Dacă la test rezultă mai puține fragmente sau nu are loc fragmentarea, se consideră că nu s-a produs explozie.

**▼B**

Se realizează mai întâi o serie de trei teste cu o placă perforată, cu orificiul cu diametrul de 6,0 mm și, dacă nu rezultă nicio explozie, se realizează o a doua serie de trei teste cu o placă cu orificiul de 2,0 mm. Dacă în oricare din seria de teste se produce explozia, nu mai este necesară continuarea testelor.

1.6.1.4. *Evaluare*

Rezultatul testului se consideră ca fiind pozitiv, dacă se produce explozie în oricare din seria de teste menționate anterior.

1.6.2. **Sensibilitatea mecanică (la șoc)**1.6.2.1. *Aparatura (figura 4)*

Piese esențiale ale unei sonete clasice cu berbec sunt un bloc de oțel turnat cu soclu, nicovală, coloană, ghidaje, greutate de șoc, dispozitiv de decuplare și suport pentru probă. Nicovala din oțel cu diametru de 100 mm și înălțimea de 70 mm este prinsă în șuruburi la partea superioară a unui bloc din oțel de 230 mm (lungime) × 250 mm (lățime) × 200 mm (înălțime) cu un soclu turnat de 450 mm (lungime) × 450 (lățime) × 60 mm (înălțime). O coloană, realizată dintr-un tub de oțel trefilat fără sudură, este prinsă într-un suport fixat cu șuruburi pe spatele blocului din oțel. Aparatul este fixat cu patru șuruburi pe un bloc din beton de 60 × 60 × 60 cm, astfel încât șinele de ghidare să fie perfect verticale și greutatea de șoc să cadă liber. Sunt disponibile greutăți de 5-10 kg, realizate din oțel calmat. Berbecul este din oțel călit, HRC 60-63, cu un diametru de minimum 25 mm.

Proba supusă testului este închisă într-un dispozitiv de șoc constituit din doi cilindri coaxiali din oțel calmat, unul deasupra celuilalt, situați într-un cilindru gol de oțel, care se folosește ca inel de ghidare. Cilindrii din oțel calmat au diametrul de 10 (- 0,003, - 0,005) mm și înălțimea de 10 mm, cu fețele lustruite, muchiile rotunjite (raza de curbă de 0,5 mm) și o duritate HRC de 58-65. Cilindrul gol trebuie să aibă un diametru exterior de 16 mm, un alezaj șlefuit de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm și o înălțime de 13 mm. Dispozitivul de șoc este asamblat pe o nicovală intermediară (diametrul 26 mm și înălțimea de 26 mm) realizată din oțel și centrată cu ajutorul unui inel de centrare cu perforații pentru a permite evacuarea vaporilor.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

Volumul eșantionului este de 40 mm<sup>3</sup> sau un volum corespunzător aparatului utilizat. Substanțele solide se supun testului în stare uscată și se pregătesc după cum urmează:

- (a) substanțele sub formă de pulberi se cern (ochiul sitei de 0,5 mm); tot materialul care a trecut prin sită se supune testului;
- (b) substanțele presate, turnate sau condensate se fărâmițează și se cern; la teste se folosește fracția dintre sita cu ochiuri de 0,5 mm și sita cu ochiuri de 1 mm, care ar trebui să fie reprezentativă.

Substanțele care se livrează în general sub formă de pastă ar trebui să fie supuse testului în stare uscată, dacă este posibil, sau, în orice caz, după eliminarea cantității maxime posibile de diluant. Pentru testarea substanțelor lichide, aparatul de testare se reglează, astfel încât între cilindrii de oțel superior și inferior să existe un spațiu de 1 mm.

**▼B****1.6.2.3. Desfășurarea testelor**

Se realizează o serie de șase teste cu o greutate de șoc de 10 kg în cădere de la 0,40 m (40 J). Dacă se obține o explozie în primele șase teste la 40 J, trebuie să se mai realizeze un set de șase teste, cu greutatea de 5 kg în cădere de la 0,15 m (7,5 J). În alt aparat, proba se compară cu substanța de referință aleasă printr-o metodă stabilită (de exemplu metoda „up-and-down” etc.).

**1.6.2.4. Evaluare**

Rezultatul se consideră pozitiv dacă se produce o explozie (izbucnirea unei flăcări și/sau un zgomot caracteristic unei explozii) cel puțin o dată în oricare din testele cu aparatul specificat sau dacă proba este mai sensibilă decât 1,3-dinitrobenzenul sau RDX într-un test alternativ de sensibilitate la șoc.

**1.6.3. Sensibilitatea mecanică (la frecare)****1.6.3.1. Aparatură (figura 5)**

Aparatul pentru testul de sensibilitate la frecare este constituit dintr-o placă de bază din fontă pe care se montează aparatul de testare la frecare. Acesta conține un bulon din porțelan și un disc mobil din porțelan. Discul din porțelan este fixat într-un culisou care se deplasează pe două ghidaje. Culisoul este cuplat la un motor electric prin intermediul unei biele, a unui excentric și unui angrenaj de transmisie corespunzător, astfel încât să se asigure o deplasare a discului de porțelan, doar o singură dată, înainte și înapoi, pe o distanță de 10 mm, sub bulonul din porțelan. Bulonul poate să fie supus unei sarcini, de exemplu, de 120 sau 360 newtoni.

Discurile din porțelan sunt realizate din porțelan tehnic (rugozitatea de 9-32  $\mu\text{m}$ ) și au dimensiuni de 25 mm (lungime)  $\times$  25 mm (lățimea)  $\times$  5 mm (înălțimea). Bulonul cilindric din porțelan se realizează, de asemenea, din porțelan tehnic și are o lungime de 15 mm, diametru de 10 mm și extremitățile rotunjite, cu suprafața rugoasă și cu o rază de curbura de 10 mm.

**1.6.3.2. Condiții experimentale**

Volumul probei este de 10 mm<sup>3</sup> sau un volum corespunzător aparatului utilizat.

Substanțele solide se supun testului în stare uscată și se pregătesc după cum urmează:

- (a) substanțele sub formă de pulberi se cern (sită cu ochiuri de 0,5 mm); tot materialul care a trecut prin sită se supune testului;
- (b) substanțele presate, formate în matriță sau condensate se fărâmițează și se cern; la teste se utilizează fracțiunea care a trecut prin site cu ochiuri < 0,5 mm.

Substanțele care se livrează în general sub formă de paste se supun testului în stare uscată, dacă este posibil. Dacă substanța nu se poate prepara în stare uscată, pasta (după eliminarea cantității maxime posibile de diluant) se supune testului sub forma unei pelicule cu următoarele dimensiuni: 0,5 mm grosime, 2 mm lățime și 10 mm lungime, realizată cu un șablon.

**▼B****1.6.3.3. Desfășurarea testelor**

Bulonul din porțelan se așează deasupra eșantionului de testat și se aplică sarcina. În timpul testului, urmele lăsate de burete pe placa de porțelan trebuie să fie dispuse transversal față de direcția de deplasare. Bulonul trebuie să rămână pe eșantion, cantitatea de substanță de testat trebuie să fie suficientă, iar discul să se deplaseze corect sub bulon. Substanțele în formă de pastă se depun, cu un șablon, sub forma unei pelicule cu grosimea de 0,5 mm și  $2 \times 10$  mm. Discul de porțelan trebuie să se deplaseze înainte și înapoi pe o distanță de 10 mm sub bulonul de porțelan timp de 0,44 secunde; cele două extremități ale fiecărui bulon se folosesc fiecare la două încercări și cele două suprafețe ale discului se utilizează fiecare la trei încercări.

Se realizează o serie de șase teste la o sarcină de 360 N. Dacă în aceste șase teste se obține un rezultat pozitiv, trebuie să se mai realizeze o serie de șase teste cu o sarcină de 120 N. În alt aparat, proba se compară cu substanța de referință aleasă printr-o metodă stabilită (de exemplu metoda „up-and-down” etc.).

**1.6.3.4. Evaluarea**

Rezultatul se consideră pozitiv dacă se produce o explozie (pocnitură și/sau zgomot sau izbucnirea unei flăcări sunt echivalente cu o explozie) cel puțin o dată în oricare din teste cu aparatul de testare la frecare specificat sau sunt satisfăcute criteriile echivalente pentru o altă test de sensibilitate mecanică (la frecare).

**2. DATE**

În principiu, se consideră că o substanță prezintă pericol de explozie în sensul prezentei directive, în cazul în care se obține un rezultat pozitiv la testele de sensibilitate termică sau de sensibilitate mecanică (la șoc sau la frecare).

**3. RAPORT****3.1. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

- identitatea, compoziția, puritatea, conținutul de umiditate etc. al substanței de testat;
- starea fizică a probei și, dacă a fost sau nu mărunțită și/sau cernută;
- observațiile din timpul testelor de sensibilitate termică (de exemplu masa probei, numărul de fragmente etc.);
- observațiile din timpul testelor de sensibilitate mecanică (de exemplu formarea unor cantități importante de fum sau descompunerea totală fără zgomot, flăcări, scântei, pocnitură etc.);
- rezultatele fiecărui tip de test;
- dacă se utilizează alte aparate, trebuie să se prezinte fundamentarea științifică, precum și dovada corelației dintre rezultatele obținute cu aparatul specificat și cele obținute cu unul echivalent;

**▼B**

— orice observație utilă, cum ar fi trimiterea la teste cu produse similare care ar putea să fie relevante pentru o interpretare corectă a rezultatelor;

— orice alte constatări relevante pentru interpretarea rezultatelor.

### 3.2. INTERPRETAREA ȘI EVALUAREA REZULTATELOR

Raportul de testare menționează toate rezultatele considerate false, anormale sau nerepresentative. Dacă unele rezultate se resping, se prezintă o explicație și rezultatele unor teste suplimentare sau alternative. Cu excepția cazului în care un rezultat anormal se pot explica, acesta trebuie să fie acceptat ca atare și să fie folosit la clasificarea substanței în consecință.

### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.
4. NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

## ▼B

## Apendice

**Exemple de specificații ale materialelor pentru testul de sensibilitate termică  
(a se vedea DIN 1623)**

1. Tubul: Specificațiile materialelor nr. 1.0336.505 g
2. Placa cu orificiu: Specificațiile materialelor nr. 1.4873
3. Flanșa filetată și piulița: Specificațiile materialelor nr. 1.3817

Figura 1

**Aparatul de testare a sensibilității termice**

(toate dimensiunile sunt date în milimetri)

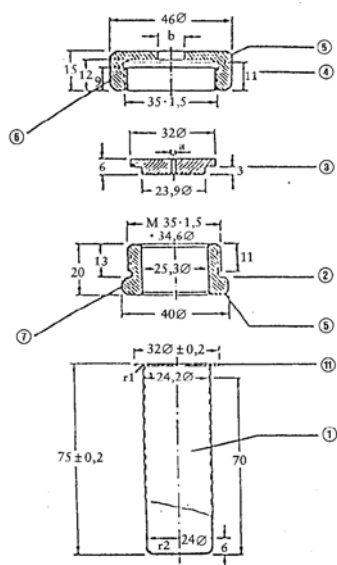


Figura 1a Tubul din oțel și accesoriile

- (1) tub
- (1a) flanșă exterioară
- (2) șaibă filetată; filet cu frecare mică
- (3) placă cu orificiu a cu diametrul = 2,0 sau 6,0 mm
- (4) piulița b cu diametrul = 10 mm
- (5) suprafață țesită
- (6) 2 țesături pentru cheie de 41

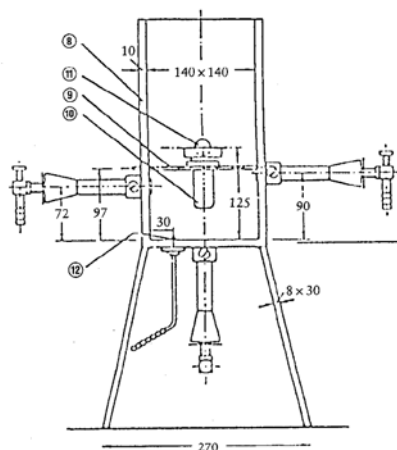


Figura 1b Dispozitivul de încălzire cu protecție

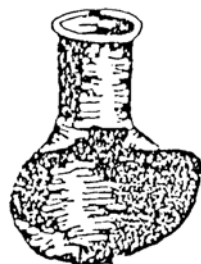
- (7) 2 țesături pentru cheie de 36
- (8) ecran de protecție împotriva așchiilor
- (9) 2 bare de susținere a tubului
- (10) tub asamblat
- (11) poziția arzătorului din spate; celelalte arzătoare sunt vizibile
- (12) jet de comandă

▼B

Figura 2

## Testul de sensibilitate termică

(Exemple de fragmentare)



Fără explozie



Fără explozie



Explozie



Explozie



Explozie

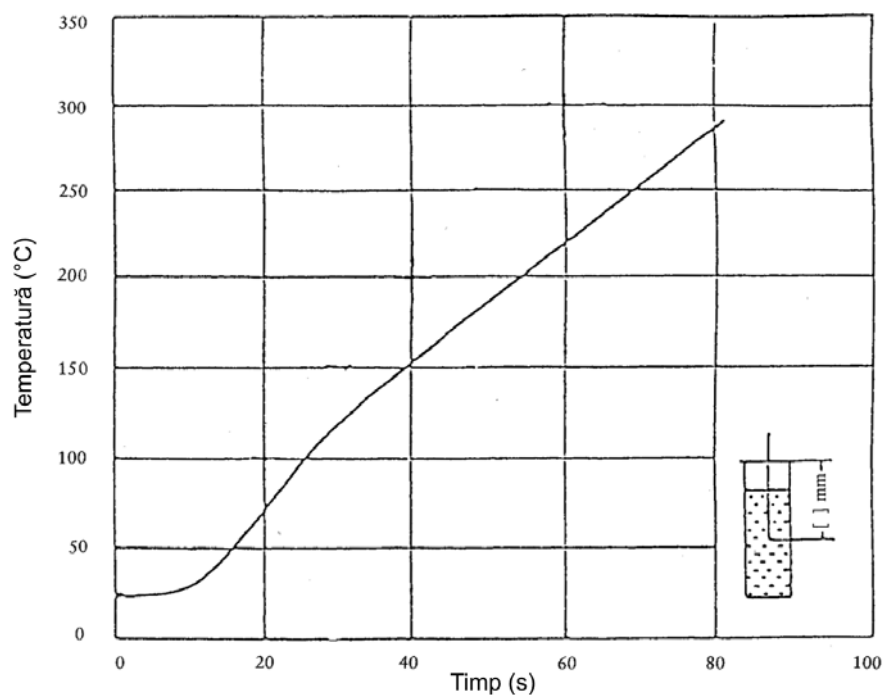


Explozie

▼ B

Figura 3

## Etalonarea vitezei de încălzire pentru testarea sensibilității termice



Curba temperatură/timp obținută la încălzirea dibutilftalatului ( $27 \text{ cm}^3$ ) într-un tub închis (placă cu orificiu de 1,5 mm) cu un debit de propan de 3,2 litri/minut. Temperatura se măsoară cu un termocuplu cromel/alumel placat cu oțel inoxidabil, cu diametrul de 1 mm, amplasat central la distanța de 43 mm sub bordura tubului. Viteza de încălzire în intervalul cuprins între 135 °C și 285 °C este între 185 și 215 K/minut.



▼ B

Figura 4

## Aparatul de testare a sensibilității mecanice (la șoc)

(toate dimensiunile în milimetri)

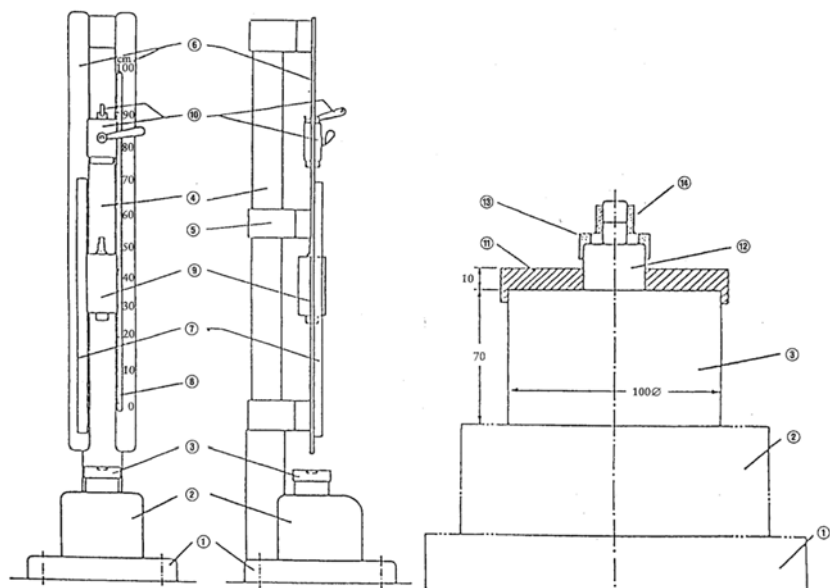


Figura 4a Sonetă, vedere frontală, laterală și de ansamblu

- (1) soclu, 450 × 450 × 60
- (2) bloc de oțel, 230 × 250 × 200
- (3) nicovală, diametru 100 × 70
- (4) coloană
- (5) traversă mediană
- (6) 2 ghidaje
- (7) cremalieră

Figura 4b Sonetă, partea inferioară

- (8) scală gradată
- (9) ciocan de șoc (masa în cădere)
- (10) dispozitiv de cuplare-decuplare
- (11) placă de fixare
- (12) nicovală intermediară (interschimbabilă), diametrul 26 × 26
- (13) inel de fixare cu orificii
- (14) dispozitiv de impact

▼ B

Figura 4

## Continuare

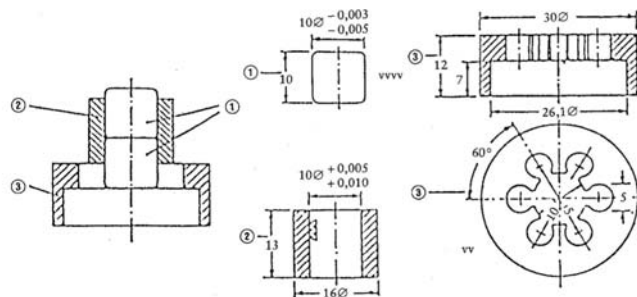


Figura 4c Dispozitivul de șoc pentru substanțele sub formă de pulberi sau pastă

Figura 4d Dispozitivul de șoc pentru substanțele lichide

- (1) cilindri de oțel
- (2) inel de ghidare pentru cilindri din oțel
- (3) inel de fixare cu orificii
  - (a) secțiune verticală
  - (b) vedere de sus
- (4) inel din cauciuc
- (5) substanță lichidă ( $40 \text{ mm}^3$ )
- (6) spațiu fără lichid

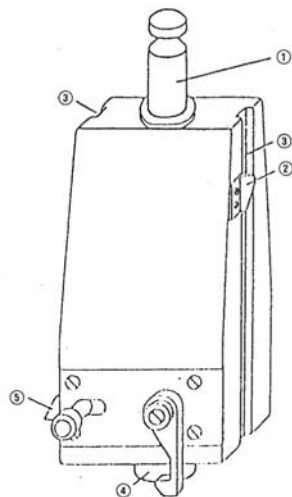
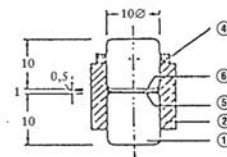


Figura 4e Ciocanul (masa de 5 kg în cădere)

- (1) lagăr axial de suspendare
- (2) indicator de înălțime
- (3) canelură de poziționare
- (4) cap cilindric de lovire
- (5) opritor de recul

▼B

Figura 5

## Aparatul de testare a sensibilității mecanice (la frecare)

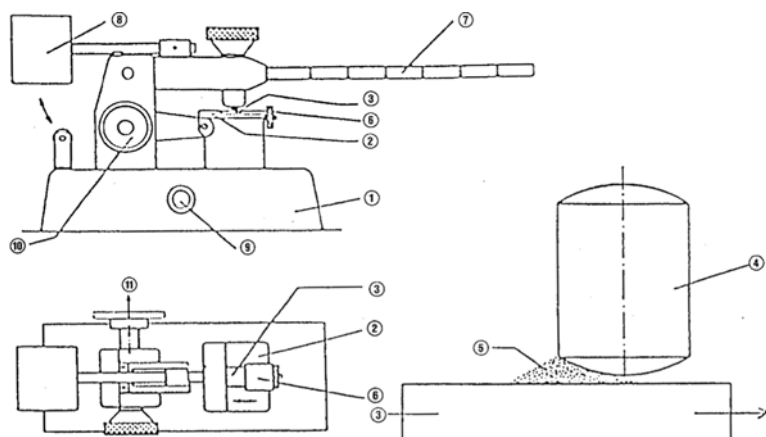


Figura 5a Aparat de testare a sensibilității mecanice (la frecare); vedere de ansamblu și de sus

- (1) soclul din oțel
- (2) culisou
- (3) disc din porțelan, 25 x 25 x 5 mm, opritor pe culisou
- (4) bulon fix din porțelan, diametrul 10 x 15 mm
- (5) eșantion, aproximativ 10 mm<sup>3</sup>
- (6) locașul bulonului

Figura 5b Poziția de pornire a știftului pe probă

- (7) braț de încărcare
- (8) contragreutate
- (9) comutator
- (10) roată pentru fixarea culisoului în poziția de pornire
- (11) direcția motorului cu acționare electrică

**▼B****A.15. PUNCTUL DE AUTOAPRINDERE (LICHIDE ȘI GAZE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Substanțele explozive și substanțele care se aprind spontan în contact cu aerul la temperatura ambiantă nu se supun prezentului test. Modul de operare este aplicabil la gaze, lichide și vapori care, în prezența aerului, se aprind la contactul cu o suprafață încălzită.

Punctul de autoaprindere scade considerabil prin influența impurităților catalitice existente, materialul suprafeței în contact sau prin creșterea volumului recipientului de testare.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Gradul de autoinflamabilitate se exprimă ca punct de autoaprindere. Punctul de autoaprindere este cea mai mică temperatură la care substanța se aprinde în contact cu aerul în condițiile definite în metoda de testare.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Substanțele de referință sunt specificate în standarde (a se vedea 1.6.3). Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateții metodei și să permită compararea cu rezultatele obținute prin alte metode.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Metoda determină temperatura minimă a suprafeței interioare a unei incinte, la care are loc aprinderea unui gaz, a vaporilor sau a unui lichid injectat în incinta respectivă.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Repetabilitatea variază în funcție de intervalul de temperaturi de autoaprindere și de metoda de testare folosită.

Sensibilitatea și specificitatea depind de metoda de testare folosită.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Aparatură**

Aparatura este descrisă în metoda menționată la punctul 1.6.3.

**1.6.2. Condiții experimentale**

Un eșantion din substanța de testat este supus testului conform metodei menționate la punctul 1.6.3.

**1.6.3. Desfășurarea testului**

A se vedea IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

**▼B****2. DATE**

Se înregistrează temperatura, presiunea atmosferică, cantitatea de probă utilizată și timpul scurs până la producerea aprinderii.

**3. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- specificațiile precise ale substanței (identificarea și proprietățile);
- cantitatea de probă utilizată, presiunea atmosferică;
- aparatura utilizată;
- rezultatele măsurărilor (temperaturile de testare, rezultatele referitoare la aprindere, timpul scurs);
- toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Niciuna.

**▼B****A.16. TEMPERATURA RELATIVĂ DE AUTOAPRINDERE PENTRU SUBSTANȚELE SOLIDE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Substanțele explozive și substanțele care se aprind spontan în contact cu aerul la temperatura ambiantă nu se supun prezentului test.

Scopul prezentului test este de a furniza informații preliminare privind autoaprinderea substanțelor solide la temperaturi ridicate.

Dacă temperatura degajată, fie prin reacția substanței cu oxigenul, fie prin descompunerea exotermă, nu se împrăștie destul de repede în mediul înconjurător, se produce autoîncălzirea care conduce la autoaprindere. Autoaprinderea se produce, prin urmare, atunci când viteza de producere a căldurii este mai mare decât viteza de pierdere a căldurii.

Metoda de testare este utilă ca test preliminar de triere a substanțelor solide. Având în vedere natura complexă a fenomenelor de aprindere și de combustie a solidelor, temperatura de autoaprindere determinată conform prezentei metode de testare se folosește numai pentru comparare.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Temperatura de autoaprindere determinată prin prezenta metodă este temperatura minimă a mediului ambiant, exprimată în °C, la care un volum determinat dintr-o substanță se aprinde în condiții definite.

**1.3. SUBSTANȚĂ DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Un anumit volum din substanță se introduce într-o etuvă la temperatura camerei; în timp ce temperatura etuvei este crescută cu o viteză de 0,5 °C/min până la 400 °C sau până la punctul de topire, dacă este mai mic, se înregistrează curba temperatură/timp pentru condițiile din centrul eșantionului. În sensul prezentului test, temperatura etuvei la care temperatura eșantionului ajunge la 400 °C prin autoîncălzire se numește temperatură de autoaprindere.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Aparatură****1.6.1.1. Etuva**

Etuvă de laborator termoreglabilă (volum de aproximativ 2 litri) prevăzută cu circulație naturală de aer și o supapă pentru atenuarea exploziei. Pentru evitarea unui posibil risc de explozie, trebuie evitat contactul tuturor gazelor de descompunere cu elementele de încălzire electrică.

**▼B****1.6.1.2.    *Cubul din plasă metalică***

Se taie o bucată dintr-o plasă fin oțel inoxidabil cu ochiuri de 0,045 mm conform modelului din figura 1. Plasa se pliază și se fixează cu sârmă într-un cub deschis la partea superioară.

**1.6.1.3.    *Termocuplurile***

Termocupluri corespunzătoare.

**1.6.1.4.    *Înregistratorul***

Orice înregistrator cu două canale etalonat de la 0 la 600 °C sau la o tensiune corespunzătoare.

**1.6.2.    **Condiții experimentale****

Substanțele se supun testului în forma în care se primesc.

**1.6.3.    **Desfășurarea testului****

Cubul se umple cu substanță, se tasează ușor, adăugând substanță până la umplerea cubului. Cubul se suspendă apoi în centrul unei etuve la temperatura camerei. Un termocuplu se instalează în centrul cubului și celălalt între cub și peretele etuvei pentru înregistrarea temperaturii din etuvă.

Temperatura etuvei și cea a probei se înregistrează permanent în timpul creșterii temperaturii etuvei până la 400 °C sau până la punctul de topire, dacă este mai mic, cu o viteză de 0,5 °C/min.

Când substanța se aprinde, termocuplul probei va indica o creștere foarte bruscă a temperaturii, peste temperatura etuvei.

**2.    **DATE****

Temperatura etuvei la care temperatura probei ajunge la 400 °C prin autoîncălzire este importantă pentru evaluare (a se vedea figura 2).

**3.    **RAPORT****

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

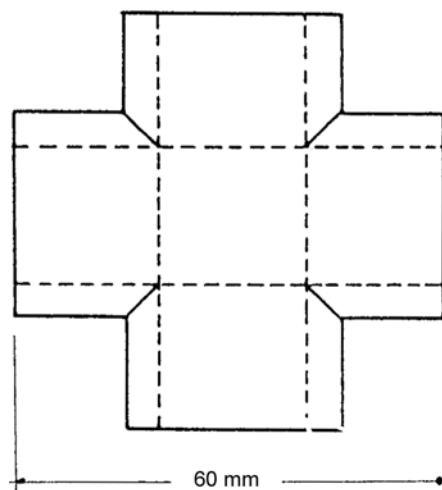
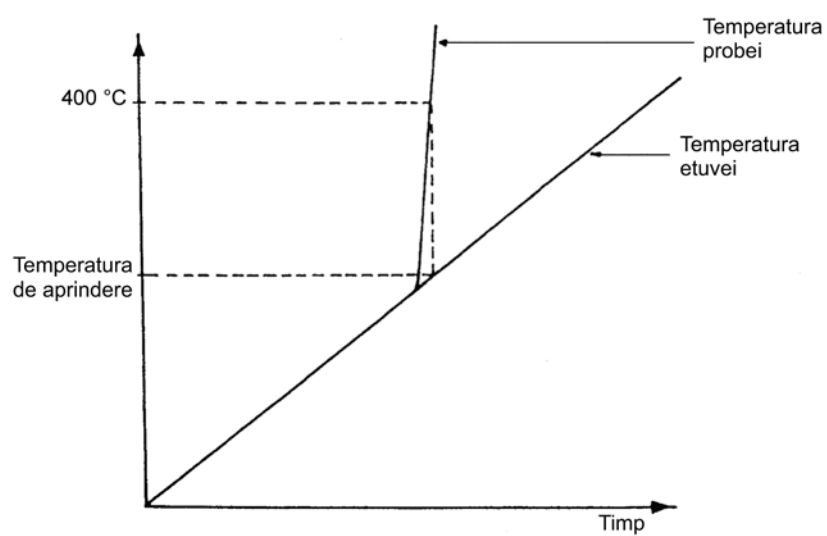
— descrierea substanței;

— rezultatele măsurărilor, inclusiv curba temperatură/timp;

— toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

**4.    **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE****

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

**▼B***Figura 1***Modelul cubului de testare de 20 mm***Figura 2***Curbă de tipul temperatură/timp**



**▼B****A.17. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (SOLIDE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Înainte de a realiza acest test, este util să se colecteze informații preliminare privind orice posibile proprietăți explozive ale substanței de testat.

Prezentul test nu se aplică lichidelor, gazelor, substanțelor explozive sau inflamabile sau peroxizilor organici.

Prezentul test nu este necesar dacă examinarea formulei structurale stabilește dincolo de orice îndoială că substanța nu are capacitate de reacție exotermă cu un material combustibil.

Pentru a stabili dacă sunt necesare precauții speciale în timpul testului, se realizează un test preliminar.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Timpul de ardere: timpul de reacție, exprimat în secunde, necesar pentru ca zona de reacție să traverseze un cartuș, în conformitate cu procedura descrisă la punctul 1.6.

Viteza de ardere: exprimată în milimetri pe secundă.

Viteza maximă de ardere: cea mai mare valoare a vitezelor de ardere obținută cu amestecuri ce conțin oxidant în proporție de 10-90 % greutate.

**1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ**

Azotatul de bariu (de puritate analitică) se folosește ca substanță de referință în test și în testul preliminar.

Amestecul de referință este amestecul constituit din azotat de bariu și pudră de celuloză, preparat conform descrierii de la punctul 1.6, care are viteza maximă de ardere (amestecul conține, de regulă, 60 % greutate azotat de bariu).

**1.4. PRINCIPIUL METODEI**

Pentru siguranță se realizează un test preliminar. În cazul în care testul preliminar indică în mod clar că substanța supusă testului are proprietăți oxidante, nu mai este necesar alt test. Dacă nu se întâmplă astfel, substanța se supune testului complet.

Pentru testul complet, se prepară amestecuri cu proporții diferite de substanță de testat și substanță combustibilă. Se prepară apoi câte un cartuș din fiecare amestec, care se aprinde la o extremitate.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Dacă este necesar, orice metodă de mărunțire și amestecare este valabilă, cu condiția ca diferența dintre viteza maximă de ardere și valoarea mediei aritmetice, în șase teste separate, să fie de maximum 10 %.

**▼B**

## 1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Pregătire**1.6.1.1. *Substanța de testat*

Proba de analizat se aduce la dimensiuni ale particulelor  $< 0,125$  mm prin următoarea metodă: se cerne substanța, se mărunțește fracția rămasă, se repetă acțiunea până când întreaga cantitate de probă trece prin sită.

Se poate utiliza orice metodă de mărunțire sau cernere care satisface criteriile de calitate.

Înainte de prepararea amestecului, substanța se usucă la  $105^{\circ}\text{C}$ , până la o greutate constantă. Dacă temperatura de descompunere a substanței de testat este mai mică de  $105^{\circ}\text{C}$ , substanța trebuie să se usuce la o temperatură mai mică.

1.6.1.2. *Substanța combustibilă*

Pulberea de celuloză se utilizează ca substanță combustibilă. Celuloza ar trebui să fie de tipul utilizat în cromatografia în strat subțire sau în cromatografia în coloană. S-a dovedit că tipul care conține mai mult de 85 % fibre cu lungimea de 0,020-0,075 mm este corespunzătoare. Pulberea de celuloză se trece printr-o sită cu ochiuri de 0,125 mm. Se folosește același lot de celuloză pentru tot testul.

Înainte de prepararea amestecului, pulberea de celuloză este uscată la  $105^{\circ}\text{C}$  până se obține o greutate constantă.

Dacă în testul preliminar se utilizează rumeguș de lemn, se prepară un rumeguș prin colectarea porțiunii care trece prin sita cu ochiuri de 1,6 mm, se amestecă cu grijă, apoi se usucă la  $105^{\circ}\text{C}$  timp de patru ore într-un strat cu o grosime de maximum 25 mm. Se răcește și se păstrează până când este necesar, de preferință într-un interval de 24 de ore de la uscare, într-un recipient etanș cât mai bine umplut.

1.6.1.3. *Sursa de ardere*

Ar trebui să se folosească flacăra unui bec de gaz (diametrul minim de 5 mm) ca sursă de aprindere. Dacă se utilizează altă sursă de aprindere (de exemplu la testul în atmosferă inertă), trebuie să se prezinte în raportul de testare descrierea și justificarea acesteia.

1.6.2. **Desfășurarea testului**

*Notă:*

Amestecurile din oxidanți și celuloză sau rumeguș trebuie să fie tratate ca posibil explozive și manipulate cu atenția cuvenită.

1.6.2.1. *Testul preliminar*

Substanța uscată se amestecă cu grijă cu celuloza uscată sau rumegușul uscat în proporții din greutate de substanță/celuloză sau rumeguș de 2:1 și din amestecul obținut se formează un cartuș conic cu dimensiunile 3,5 cm (diametrul la bază)  $\times$  2,5 cm (înălțimea) prin umplerea, fără îndesare, a unei forme conice (de exemplu o pâlnie din sticlă de laborator cu robinetul închis).

**▼B**

Cartușul este așezat pe o placă rece, necombustibilă, neporoasă și cu conductibilitate termică redusă. Testul ar trebui să se realizeze sub nișă de tiraj, conform descrierii de la punctul 1.6.2.2.

Sursa de aprindere se aduce în contact cu conul. Se urmăresc amploarea și durata reacției rezultate și se înregistrează.

Dacă reacția este viguroasă, substanța se consideră ca fiind oxidantă.

Dacă rezultatele nu sunt certe, este necesar să se realizeze testul complet descris în continuare.

**1.6.2.2. Test complet**

Se prepară amestecuri oxidant/celuloză ce conțin 10-90 % greutate oxidant, cu o rație de creștere de 10 % a cantității de oxidant. Pentru cazurile-limită, ar trebui să se utilizeze amestecuri intermediare oxidant/celuloză pentru a obține viteza maximă de ardere cu mai multă precizie.

Cartușul se obține cu o matriță. Matrița este din metal, are o lungime de 250 mm și o secțiune transversală triunghiulară cu o înălțime interioară de 10 mm și o lățime interioară de 20 mm. Pe ambele fețe ale matriței, pe direcție longitudinală, se montează două plăci metalice ca opritoare laterale care depășesc cu 2 mm extremitatea superioară a secțiunii transversale triunghiulare (figura). Dispozitivul obținut se umple fără tasare cu amestec, puțin în exces. După ce se lasă matrița să cadă de la o înălțime de 2 cm pe o suprafață solidă, substanța în exces se curăță cu o racletă oblică. Plăcile opritoare se scot și pulberea rămasă se netezește cu un rulou. Se așează apoi o placă cu conductibilitate termică mică, neporoasă și necombustibilă peste formă, ansamblul se răstoarnă și se scoate forma.

Se introduce cartușul în nișă, perpendicular pe direcția curentului de aer.

Viteza aerului trebuie să fie suficientă pentru a preveni răspândirea vaporilor în laborator și ar trebui să fie constantă în timpul testului. Curentul de aer trebuie să formeze un ecran în jurul aparatului.

Datorită caracterului higroscopic al celulozei și al unor substanțe de testat, testul se execută cât se poate de repede.

Se aprinde un capăt al cartușului prin contactul cu flacăra.

Se măsoară timpul de reacție pe o distanță de 200 mm după ce zona de reacție s-a propagat pe o distanță inițială de 30 mm.

Testul se realizează cu substanța de referință și cel puțin o dată cu fiecare amestec din gama celor constituite din substanța de testat și celuloză în diferite proporții.

Dacă se constată o viteză maximă de ardere cu mult mai mare decât cea a amestecului de referință, testul se poate opri; în caz contrar, testul se repetă de cinci ori pentru fiecare din cele trei amestecuri care au cea mai mare viteză de ardere.

**▼B**

Dacă se suspectează un rezultat fals pozitiv, atunci ar trebui să se repete testul cu o substanță inertă cu particule de dimensiuni similare, de exemplu kiselgur, în loc de celuloză. O altă posibilitate constă în repetarea testului cu amestecul cu viteza de ardere cea mai mare, în atmosferă inertă (cu un conținut de oxigen  $< 2\%$  v/v).

## 2. **DATE**

Din motive de siguranță, se consideră că viteza maximă de ardere – nu valoarea medie – reprezintă proprietatea oxidantă maximă a substanței supuse testului.

Valoarea cea mai mare a vitezei de ardere într-o serie de șase teste pe un amestec dat este relevantă pentru evaluare.

Se reprezintă grafic valoarea cea mai mare a vitezei de ardere pentru fiecare amestec în funcție de concentrația oxidantului. Din grafic se citește viteza maximă de ardere.

Cele șase valori ale vitezei de ardere măsurate într-un set realizat cu amestecul cu viteza maximă de ardere trebuie să difere cu maximum 10 % față de valoarea mediei aritmetice; în caz contrar, sunt necesare metode îmbunătățite de mărunțire și amestecare.

Se compară viteza maximă de ardere cu viteza maximă de ardere a amestecului de referință (a se vedea punctul 1.3).

Dacă încercările se realizează în atmosferă inertă, se compară viteza maximă de reacție cu cea obținută cu amestecul de referință în atmosferă inertă.

## 3. **RAPORT**

### 3.1. **RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- identitatea, compoziția, puritatea, conținutul de umiditate etc. ale substanței de testat;
- orice tratament aplicat eșantionului (de exemplu măcinare, uscare,...);
- sursa de aprindere folosită;
- rezultatele măsurărilor;
- tipul reacției (de exemplu ardere superficială cu flacără, ardere în întreaga masă, orice informații privind produsele de ardere, ...);
- orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor, inclusiv descrierea vigoriei (flacără, scântei, degajare de vapori, ardere înăbușită înceată etc.) și durata aproximativă obținută în testul preliminar de siguranță/triere atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța de referință;
- rezultatele testelor cu substanță inertă, după caz;
- rezultatele testelor în atmosferă inertă, după caz.

**▼B**

## 3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Se consideră că o substanță este substanță oxidantă, în cazul în care:

- (a) la testul preliminar există o reacție viguroasă;
- (b) la testul complet viteza maximă de ardere a amestecurilor testate este mai mare decât sau egală cu viteza maximă de ardere a amestecului de referință constituit din celuloză și azotat de bariu.

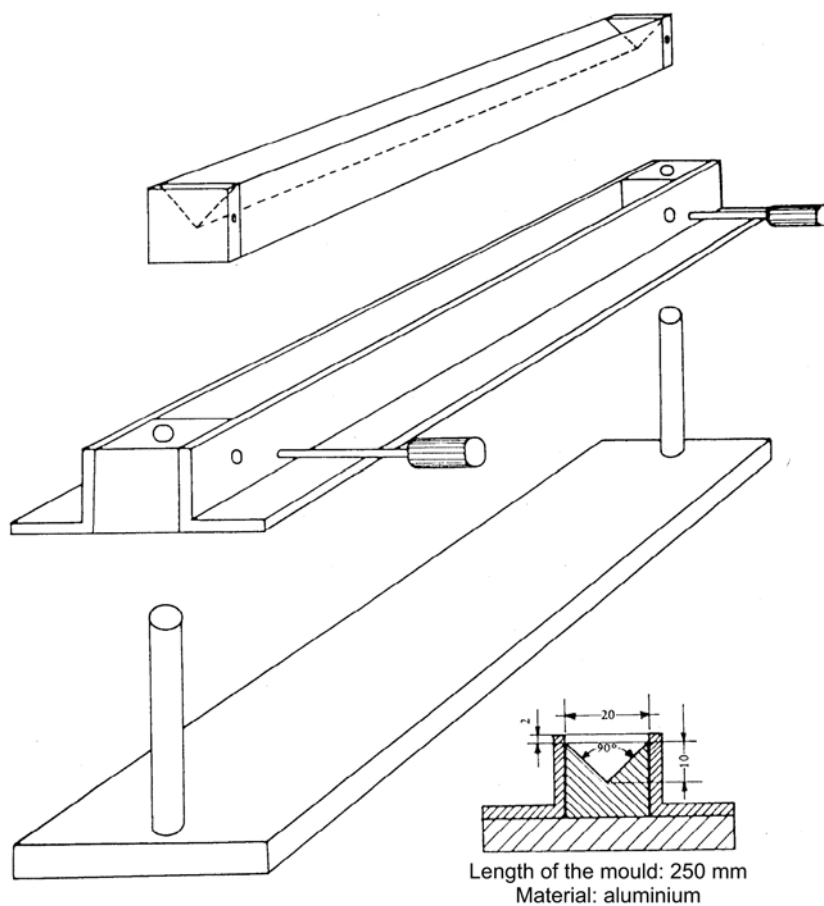
Pentru a se evita rezultatele fals pozitive, la interpretarea rezultatelor se iau în considerare și rezultatele obținute la testarea substanței cu un material inert și/sau la testul în atmosferă inertă.

## 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

NF T 20-035 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

**▼B***Apendice**Figură***Matrița și accesoriile pentru prepararea cartușului**

(Toate dimensiunile sunt în milimetri)



**▼B****A.18. DETERMINAREA MASEI MOLECULARE NUMERICE MEDII  
ȘI A DISTRIBUȚIEI MASELOR MOLECULARE A  
POLIMERILOR****1. METODĂ**

Această metodă cromatografică pe gel permeabil urmează Orientarea 118 (1996) a OCDE. Principiile fundamentale și toate celelalte informații tehnice sunt prezentate în bibliografie.

**1.1. INTRODUCERE**

Proprietățile polimerilor sunt atât de diversificate, încât este imposibil de descris o metodă unică, care să indice cu precizie condițiile de separare și evaluare, care să acopere toate eventualele și particularitățile întâlnite la separarea polimerilor. Sistemele complexe de polimeri, în special, se pretează mai rar la cromatografia pe gel permeabil. În cazul în care cromatografia pe gel permeabil nu este aplicabilă, se poate determina conținutul de polimeri cu masă moleculară medie, utilizând alte metode (a se vedea apendicele). Într-o astfel de situație, este necesară furnizarea tuturor detaliilor legate de metoda folosită, cu justificarea alegerii.

Metoda descrisă în continuare se bazează pe norma DIN 55672 (1). Aceasta furnizează indicații detaliate asupra modului de realizare a experiențelor și de evaluare a rezultatelor. Dacă este necesară modificarea condițiilor experimentale, schimbările trebuie justificate. Pot fi utilizate alte normative, cu condiția menționării tuturor referințelor. Metoda descrisă utilizează pentru etalonare eșantioane de polistiren a căror polidispersie este cunoscută și ar putea fi, probabil, adaptată pentru cazul altor polimeri, de exemplu, polimerii solubili în apă și polimerii ramificați cu catenă lungă.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Masa moleculară numerică medie  $M_n$  și masa moleculară medie ponderală  $M_w$ , se determină prin ecuațiile următoare:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

unde:

$H_i$  este amplitudinea semnalului detectat, corespunzător volumului de retenție  $V_i$ , față de nivelul de referință;

$M_i$  este masa moleculară a fracțiunii de polimer, corespunzătoare volumului de retenție  $V_i$  și

$n$  este numărul de puncte experimentale.

Lărgimea distribuției maselor moleculare, care reprezintă o măsură a polidispersiei sistemului, este exprimată de raportul  $M_w/M_n$ .

**▼B****1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Metoda cromatografiei pe gel permeabil este o metodă relativă, fiind necesar să se procedeze la o etalonare. În general, aceasta se realizează cu ajutorul polistirenilor etalon cu lanț liniar și distribuție îngustă, pentru care se cunosc atât masele moleculare medii  $M_n$  și  $M_w$ , cât și distribuția maselor moleculare. Curba de etalonare nu poate fi utilizată pentru determinarea masei moleculare a unui eșantion necunoscut, decât dacă condițiile de separare a eșantioanelor și etaloanelor au fost selecționate într-un mod identic.

O relație determinată între masa moleculară și volumul de eluare nu este valabilă decât în condițiile particulare ale unei experiențe date. Printre aceste condiții figurează, înainte de toate: temperatura, solventul (sau amestecul de solvenți), condițiile cromatografice, precum și coloana de separare sau sistemul de coloane.

Masele moleculare ale eșantioanelor determinate prin această metodă constituie valori relative; le vom numi „mase moleculare în echivalent-polistiren”. Aceasta semnifică faptul că, în funcție de diferențele chimice și structurale dintre eșantioanele testate și etaloane, masele moleculare pot devia față de valorile absolute, într-o manieră mai mult sau mai puțin importantă. Dacă sunt utilizate alte etaloane, de exemplu, polietilenglicol, poli(etilenoxid), poli(metacrilat de metil) sau acid poliacrilic, este important să se justifice motivul.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Cromatografia pe gel permeabil permite determinarea distribuției maselor moleculare, precum și a maselor moleculare medii ( $M_n$ ,  $M_w$ ). Cromatografia pe gel permeabil reprezintă o metodă particulară de cromatografie lichidă, în cadrul căreia eșantionul pentru testat este separat în funcție de volumul hidrodinamic al fiecărui constituent (2).

Separarea se efectuează pe măsură ce eșantionul înaintază printr-o coloană umplută cu un material poros, în general un gel organic. Moleculele mici pot penetra în pori, în vreme ce moleculele mari sunt excluse. Din acest motiv, traseul moleculelor mari este mai scurt; acestea sunt separate primele. Moleculele de dimensiuni medii penetrează parțial în pori, fiind separate mai târziu. Moleculele cele mai mici, a căror rază hidrodinamică medie este mai mică decât cea a porilor de gel, pot penetra în toți porii. Acestea vor fi eluate ultimele.

În situația ideală, dimensiunea speciilor moleculare este cea care decide integral separarea, dar în practică, este greu de evitat interferența unor fenomene de absorbție. O umplere neregulată a coloanei, ca și existența unui volum mort important, pot agrava situația (2).

Detecția se efectuează, de exemplu, prin măsurarea indicelui de refracție sau al absorbției în UV, pentru realizarea unei curbe de distribuție simple. Totuși, pentru a putea asocia acestei curbe valorile maselor moleculare reale, este necesară etalonarea coloanei prin trecerea unui polimer cu masa moleculară cunoscută și, în cazul ideal, cu o structură cât mai apropiată, de exemplu diferiți polistireni standard. În general, se va obține o curbă Gauss; uneori, aceasta poate prezenta o asimetrie, pe partea maselor moleculare mici; axa verticală indică cantitatea (greutatea) speciilor de diferite mase moleculare eluate, iar pe axa orizontală, figurează logaritmul masei moleculare.



**▼ B****1.5. CRITERII DE CALITATE**

Reproductivitatea (deviația-standard relativă) a volumului de eluare trebuie să fie cel mult egală cu 0,3 %. Există modalități de ameliorare a reproductivității de analiză, grație unei corecții ce utilizează un standard intern, dacă un cromatograf este evaluat în funcție de timp și nu satisface criteriile menționate mai sus [a se vedea informațiile complementare la referința (1)]. Polidispersările depind de masele moleculare ale etaloanelor. În cazul polistirenului etalon, valorile tipice sunt:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

( $M_p$  este masa moleculară a etalonului, corespunzătoare semnalului maxim)

**1.6. DESCRIEREA METODEI****1.6.1. Prepararea soluțiilor etalon de polistiren**

Se vor dizolva polistirenii etalon, amestecând cu grijă până la diluția aleasă. Soluțiile se vor prepara ținând cont de recomandările fabricantului.

Concentrațiile etaloanelor alese depind de diferiți factori, cum ar fi: volumul de injecție, viscozitatea soluției și sensibilitatea detectorului. Volumul de injecție maxim trebuie să fie adaptat lungimii coloanei, având grijă să nu o supraîncarce. Volumele de injecție curente pentru separările analitice prin metoda cromatografică pe gel permeabil, pentru o coloană de 30 cm × 7,8 mm, variază de obicei între 40 și 100 μl. Se va determina raportul optim între volumul de injecție și concentrație, înainte de etalonarea coloanei.

**1.6.2. Prepararea soluției de eșantion**

În principiu, prepararea soluțiilor de eșantion se realizează în condiții identice. Eșantionul se dizolvă într-un solvent adecvat, de exemplu THF, agitând cu grijă. În niciun caz, nu se va dizolva într-o baie cu ultrasunete. Dacă este necesar, soluția de probă se purifică cu ajutorul unui filtru cu membrană, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 0,2-2 μm.

Prezența particulelor nedizolvate trebuie menționată în raportul final, în măsura în care acestea pot rezulta din specii cu mase moleculare mari. Trebuie să se recurgă la o metodă potrivită pentru determinarea procentajului în greutate a particulelor nedizolvate. Analiza soluțiilor se va face în termen de 24 ore.

**1.6.3. Aparatură**

- un rezervor pentru solvent;
- un sistem pentru degazare (dacă este necesar);
- o pompă;

**▼B**

- un amortizor de impulsuri (dacă este necesar);
- un sistem de injecție;
- coloane cromatografice;
- un detector;
- un debitmetru (dacă este necesar);
- un sistem de înregistrare și tratare a datelor;
- un recipient pentru recuperarea soluțiilor utilizate.

Sistemul cromatografic pe gel permeabil trebuie să fie inert față de solventul utilizat (de exemplu, utilizarea capilarelor din oțel, atunci când solvent este THF).

#### 1.6.4. **Injecția și sistemul de pompare a solventului**

Un volum definit din soluția de probă este injectat în coloană, într-o zonă bine definită, cu ajutorul unui aparat pentru eșantionare automată sau manuală. Dacă se operează manual, retragerea ori împingerea prea bruscă a pistonului seringii poate determina modificări în distribuția maselor moleculare observate. Este indicat ca sistemul de pompare a solventului să fie lipsit de pulsații; este de preferat ca acesta să includă un amortizor de impulsuri. Debitul este de ordinul a 1 ml/min.

#### 1.6.5. **Coloana**

În funcție de natura eșantionului testat, polimerul se caracterizează făcând recurs la o singură coloană sau la mai multe coloane, conectate în serie. În comerț sunt disponibile mai multe materiale poroase pentru coloane, cu proprietăți definite (de exemplu, dimensiunea porilor, limita de excludere). Alegerea unui gel de separare sau a lungimii de coloană depinde, pe de o parte, de proprietățile eșantionului testat (volum hidrodinamic, distribuția maselor moleculare) și, pe de altă parte, de condițiile particulare ale separării, cum ar fi: natura solventului, temperatura și debitul (1) (2) (3).

#### 1.6.6. **Talere teoretice**

Coloana (sau combinația de coloane) utilizată pentru separare trebuie caracterizată prin numărul de talere teoretice. Pentru aceasta, în cazul în care solventul de eluare este THF, se trece o soluție de etilbenzen sau o altă substanță dizolvată nepolară potrivită, printr-o coloană de lungime cunoscută. Numărul de talere teoretice este dat de ecuația următoare:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{sau} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

unde:

$N$  = numărul de talere teoretice

$V_e$  = volumul de eluare, corespunzător semnalului maxim

**▼B**

$W$  = lărgimea semnalului maxim, la nivelul liniei de bază

$W_{1/2}$  = este lărgimea semnalului maxim, la jumătatea înălțimii coloanei

#### 1.6.7. **Eficacitatea separării**

În afară de numărul de talere teoretice, parametru determinant al lărgimii de bandă, eficacitatea de separare este o altă importantă caracteristică, determinată de panta curbei de calibrare. Eficacitatea de separare a unei coloane se calculează cu ajutorul relației următoare:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secțiunea coloanei}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

unde:

$V_{e, M_x}$  = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară  $M_x$

$V_{e,(10.M_x)}$  = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară de 10 ori mai mare

Rezoluția sistemului este în general definită după cum urmează:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

unde:

$V_{e1}, V_{e2}$  = volumele de eluare ale celor doi polistireni standard la semnalul maxim

$W_1, W_2$  = lărgimile vârfului la nivelul liniei bazei

$M_1, M_2$  = masele moleculare corespunzătoare semnalului maxim (aceste mase ar trebui să fie diferite printr-un factor 10)

Valoarea lui R pentru sistemul de coloane trebuie să fie superioară valorii de 1,7 (4).

#### 1.6.8. **Solvenți**

Toți solvenții trebuie să aibă o mare puritate (se va folosi THF de puritate 99,5 %). Rezervorul pentru solvent (la nevoie, pus în atmosferă de gaz inert), trebuie să fie suficient de mare pentru a permite etalonarea coloanei și mai multe analize de eșantioane. Solventul va fi degazat înainte de a fi pompat în coloană.

#### 1.6.9. **Reglarea temperaturii**

Temperatura componentelor interne critice (bucla de injecție, coloana sau coloanele, detectorul și tuburile) trebuie să fie constantă și compatibilă cu solventul ales.

**▼B****1.6.10. Detectorul**

Detectorul înregistrează în mod cantitativ concentrația eșantionului eluat din coloană. Pentru evitarea unei lărgimi nedorite a picului, volumul cuvei detectorului va fi ales cât mai mic posibil. Acesta nu trebuie să depășească 10  $\mu$ l, cu excepția detectoarelor ce funcționează prin difuzia luminii și a viscozimetrelor. În general, detecția se realizează prin refractometrie diferențială. Totuși, dacă proprietățile specifice ale eșantionului sau ale solventului pentru eluare o cer, se pot folosi alte tipuri de detectoare, cum ar fi cele UV/VIS sau IR, viscozimetrele etc.

**2. DATE ȘI RAPORT****2.1. DATE**

Se va face referință la normele DIN (1) în ceea ce privește criteriile de evaluare detaliate, la fel pentru specificațiile relative la colectarea și interpretarea datelor.

Pentru fiecare eșantion analizat, se vor realiza două experiențe independente. Rezultatele acestora se vor analiza separat.

Parametrii  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$ ,  $M_p$  se determină pentru fiecare măsurătoare. Trebuie indicat în mod explicit că valorile măsurate sunt valori relative corespunzând unor echivalenți de masă moleculară ale standardului folosit.

După determinarea volumelor și a timpilor de retenție (eventual corectate cu ajutorul unui standard intern) se vor reprezenta grafic valorile  $\log M_p$  ( $M_p$  fiind semnalul maxim al polimerilor standard), în funcție de una dintre acele cantități. Sunt necesare cel puțin 2 puncte de etalonare pentru fiecare factor 10 de masă moleculară. Pentru trasarea întregii curbe sunt necesare cel puțin 5 puncte de măsură; această curbă va acoperi masa moleculară estimată a eșantionului. Punctul extrem al curbei de etalonare, spre partea maselor moleculare mici, se poate defini folosind n-hexilbenzenul sau altă substanță dizolvată nepolară adecvată. Masele moleculare medii, ca număr și ca greutate, sunt în general determinate prin prelucrarea informatică a datelor, bazată pe formule menționate la punctul 1.2. Dacă s-a optat pentru o prelucrare manuală, este indicat să se consulte ASTM D 3536-91 (3).

Curba de distribuție va fi prezentată sub forma unui tabel sau a unui grafic (frecvență diferențială sau procentajele cumulative în funcție de  $\log M$ ). În cazul reprezentării grafice, o putere de 10 pentru masa moleculară corespunde în mod normal, unei lărgimi de aproximativ 4 cm, în vreme ce pentru maximul de semnal, este adecvată o înălțime de aproximativ 8 cm. În cazul curbelor de distribuție cumulative, diferența între 0 și 100 % pe axa ordonatei trebuie să fie în jur de 10 cm.

**2.2. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare va cuprinde informațiile următoare:

**2.2.1. Substanța testată:**

— informații disponibile legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități);

**▼B**

- descrierea tratamentului aplicat eșantionului, observații, probleme.

**2.2.2. Dispozitivul experimental:**

- un rezervor pentru solvent, gaz inert, sistem pentru degazarea solventului, compoziția solventului, impurități;
- pompă, amortizor de impulsuri, sistem de injecție;
- coloane de separare (fabricant, toate precizările legate de caracteristicile coloanei, cum ar fi dimensiunea porilor, natura materialului de separare etc., numărul, lungimea și ordinul coloanelor utilizate);
- numărul de talere teoretice ale coloanei (sau al combinației de coloane), eficacitatea separării (resorbția sistemului);
- informații legate de simetria semnalelor maxime;
- temperatura coloanei, modul de reglare a temperaturii;
- detector (principiul de măsurare, tip, volumul cuvei);
- debitmetru dacă există (fabricant, principiul de măsurare);
- sistemul utilizat pentru culegere și prelucrarea datelor (echipament și programe informatice).

**2.2.3. Etalonarea sistemului:**

- descrierea detaliată a metodei utilizate pentru determinarea curbei de etalonare;
- precizări asupra criteriilor de calitate proprii acestei metode (de exemplu, coeficientul de corelare, eroarea pătratică medie etc.);
- informații asupra tuturor extrapolărilor, ipotezelor și aproximațiilor efectuate în cursul proceselor experimentale, precum și asupra evaluării și prelucrării datelor;
- toate măsurătorile efectuate pentru stabilirea curbei de etalonare trebuie prezentate sub forma unui tabel, care cuprinde, pentru fiecare punct de etalonare, următoarele informații:
  - denumirea eșantionului;
  - fabricantul eșantionului;
  - valorile caracteristice  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  ale etaloanelor furnizate de fabricant, deduse din măsurătorile ulterioare, completate de indicațiile legate de metoda de determinare;
  - volumul de injecție și concentrația soluției injectate;

**▼B**

- valoarea de  $M_p$  utilizată pentru etalonare;
- volumul de eluare sau timpul de retenție corectat, măsurat la semnalul maxim;
- $M_p$  calculat la semnalul maxim;
- procentajul de eroare la  $M_p$  calculat și la valoarea de etalonare.

**2.2.4. Evaluare:**

- evaluare în funcție de timp: toate metodele care vizează ameliorarea reproductivității cerute (metode de corecție, standard intern etc.);
- se precizează dacă evaluarea s-a efectuat plecând de la volumul de eluare sau de la timpul de retenție;
- se indică limitele de evaluare, dacă un pic nu a fost complet analizat;
- se descriu metodele de netezire, dacă s-au folosit;
- se indică procedeele de preparare și pretratare a eșantionului;
- dacă există, se indică prezența particulelor nedizolvate;
- se indică volumul de injecție ( $\mu$ l) și concentrația de injecție (mg/ml);
- se menționează observațiile privind efectele generatoare de deviații, în raport cu profilul ideal de cromatografie pe gel permeabil;
- se descriu în detaliu toate modificările aduse procedurilor de analiză;
- se precizează intervalele de eroare;
- se consemnează orice alte informații și observații utile pentru interpretarea rezultatelor.

**3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
3. ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

**▼B***Apendice***Exemple de alte metode de determinare a masei moleculare numerice medii ( $M_n$ ) a polimerilor**

Cromatografia pe gel permeabil reprezintă metoda preferată pentru determinarea  $M_n$ , mai ales atunci când dispunem de un ansamblu de substanțe standard cu o structură comparabilă cu cea a polimerului. Totuși, atunci când folosirea metodei cromatografiei pe gel permeabil prezintă dificultăți practice sau când ne putem aștepta ca substanța să nu satisfacă un criteriu reglementar pentru  $M_n$  (ceea ce cere o confirmare), există metode alternative, ca de exemplu:

**1. Utilizarea proprietăților coligative****1.1. Ebullioscopia și crioscopia**

înseamnă măsurarea creșterii punctului de fierbere (ebullioscopia) sau coborârea punctului de congelare (crioscopia) ale unui solvent atunci când este adăugat un polimer. Metoda se bazează pe faptul că dizolvarea unui polimer într-un lichid are un efect asupra punctelor de fierbere sau de congelare ale acestuia care depinde de masa moleculară a polimerului (1) (2).

Domeniul de aplicare corespunde unei  $M_n < 20\,000$ .

**1.2. Coborârea presiunii vaporilor**

constă în măsurarea presiunii vaporilor unui lichid de referință înainte și după adăugarea unor cantități stabilite de polimeri (1) (2).

Domeniul de aplicare corespunde unei  $M_n < 20\,000$  (în teorie; în practică, nu reprezintă decât o valoare limitată).

**1.3. Osmometria cu membrană**

se bazează pe principiul osmozei, adică tendința naturală a moleculelor de solvent de a traversa o membrană semipermeabilă plecând de la o soluție diluată către o soluție concentrată așa încât să se realizeze echilibrul. În experiment, concentrația soluției diluate este nulă, în timp ce soluția concentrată conține polimerul. Trecerea solventului de-a lungul membranei induce o diferență de presiune care depinde de concentrație și de masa moleculară a polimerului (1) (3) (4).

Domeniul de aplicare corespunde valorilor lui  $M_n$  între 20 000 și 200 000.

**1.4. Osmometria – faza de vapori**

constă în comparația vitezei de evaporare a unui aerosol de solvent pur cu viteza a cel puțin trei aerosoli care conțin polimerul la diferite concentrații (1) (5) (6).

Domeniul de aplicare corespunde unei  $M_n < 20\,000$ .

**▼B****2. Analiza grupurilor terminale**

Pentru a se utiliza această metodă, trebuie cunoscute atât structura globală a polimerului, cât și natura grupurilor terminale situate în capetele catenei (acestea trebuie să poată fi diferențiate de catena principală, de exemplu, prin spectrul lor RMN sau prin titrarea și formarea derivaților). Determinarea concentrației moleculare a grupurilor terminale prezente pe polimer poate, apoi, să furnizeze o valoare a masei moleculare (7) (8) (9).

Domeniul de aplicare corespunde valorilor lui  $M_n$  ce pot atinge valoarea de 50 000 (cu o fiabilitate descrescătoare)

**3. Referințe bibliografice**

1. Billmeyer, F.W. Jr., (1984), Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
2. Glover, C.A., (1975), Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
3. ASTM D 3750-79, (1979), Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
5. ASTM 3592-77, (1977), Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
6. Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
7. Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989), Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
8. Garmon, R.G., (1975), End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
9. Amiya, S., et al. (1990), Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.



**▼B****A.19. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN POLIMERI CU MASĂ MOLECULARĂ MICĂ****1. METODĂ**

Această metodă cromatografică pe gel permeabil urmează Orientarea 118 (1996) a OCDE. Principiile fundamentale și toate celelalte informații tehnice sunt prezentate în bibliografie.

**1.1. INTRODUCERE**

Proprietățile polimerilor sunt atât de diversificate, încât este imposibil de descris o metodă unică, care să indice cu precizie condițiile de separare și evaluare, care să acopere toate eventualitățile și particularitățile întâlnite la separarea polimerilor. Sistemele complexe de polimeri, în special, se pretează mai rar la cromatografia pe gel permeabil. În cazul în care cromatografia pe gel permeabil nu este aplicabilă, se poate determina conținutul de polimeri cu masă moleculară medie, utilizând alte metode (a se vedea apendicele). Într-o astfel de situație, este necesară furnizarea tuturor detaliilor legate de metoda folosită, cu justificarea alegerii.

Metoda descrisă în continuare se bazează pe norma DIN 55672 (1). Aceasta furnizează indicații detaliate asupra modului de realizare a experiențelor și de evaluare a rezultatelor. Dacă este necesară modificarea condițiilor experimentale, schimbările trebuie justificate. Pot fi utilizate alte normative, cu condiția menționării tuturor referințelor. Metoda descrisă utilizează pentru etalonare eșantioane de polistiren a căror polidispersie este cunoscută și ar putea fi, probabil, adaptată pentru cazul altor polimeri, de exemplu, polimerii solubili în apă și polimerii ramificați cu catenă lungă.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Masa moleculară mică se definește în mod arbitrar ca fiind o masă moleculară inferioară celei de 1 000 daltoni.

Masa moleculară medie (numerică)  $M_n$  și masa moleculară medie (greutate)  $M_w$ , sunt determinate cu ajutorul ecuațiilor următoare:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

unde:

$H_i$  = amplitudinea semnalului detectat, corespunzător volumului de retenție  $V_i$ , în funcție de nivelul de referință,

$M_i$  = este masa moleculară a fracțiunii de polimer, corespunzătoare volumului de retenție  $V_i$  și  $n$  este numărul de puncte experimentale

Lărgimea de distribuție a maselor moleculare, care reprezintă o măsură a polidispersiei sistemului, este exprimată de raportul  $M_w/M_n$ .

**▼B****1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Metoda cromatografiei pe gel permeabil este o metodă relativă, fiind necesar să se procedeze la o etalonare. În general, aceasta se realizează cu ajutorul polistirenilor etalon cu lanț liniar și distribuție îngustă, pentru care se cunosc atât masele moleculare medii  $M_n$  și  $M_w$ , cât și distribuția maselor moleculare. Curba de etalonare nu poate fi utilizată pentru determinarea masei moleculare a unui eșantion necunoscut, decât dacă condițiile de separare a eșantioanelor și etaloanelor au fost selecționate într-un mod identic.

O relație determinată între masa moleculară și volumul de eluare nu este valabilă decât în condițiile particulare ale unei experiențe date. Printre aceste condiții figurează, înainte de toate: temperatura, solventul (sau amestecul de solvenți), condițiile cromatografice, precum și coloana de separare sau sistemul de coloane.

Masele moleculare ale eșantioanelor determinate prin această metodă constituie valori relative; le vom numi „mase moleculare în echivalent-polistiren”. Aceasta semnifică faptul că, în funcție de diferențele chimice și structurale dintre eșantioanele testate și etaloane, masele moleculare pot devia față de valorile absolute, într-o manieră mai mult sau mai puțin importantă. Dacă sunt utilizate alte etaloane, de exemplu, polietilenglicol, poli(etilenoxid), poli(metacrilat de metil) sau acid poliacrilic, este important să se justifice motivul.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Cromatografia pe gel permeabil permite determinarea distribuției maselor moleculare, precum și a maselor moleculare medii ( $M_n$ ,  $M_w$ ). Cromatografia pe gel permeabil reprezintă o metodă particulară de cromatografie lichidă, în cadrul căreia eșantionul pentru testat este separat în funcție de volumul hidrodinamic al fiecărui constituent (2).

Separarea se efectuează pe măsură ce eșantionul înaintează printr-o coloană umplută cu un material poros, în general un gel organic. Moleculele mici pot penetra în pori, în vreme ce moleculele mari sunt excluse. Din acest motiv, traseul moleculelor mari este mai scurt; acestea sunt separate primele. Moleculele de dimensiuni medii penetrează parțial în pori, fiind separate mai târziu. Moleculele cele mai mici, a căror rază hidrodinamică medie este mai mică decât cea a porilor de gel, pot penetra în toți porii. Acestea vor fi eluate ultimele.

În situația ideală, dimensiunea speciilor moleculare este cea care decide integral separarea, dar în practică, este greu de evitat interferența unor fenomene de absorbție. O umplere neregulată a coloanei, ca și existența unui volum mort important, pot agrava situația (2).

Detecția se efectuează, de exemplu, prin măsurarea indicelui de refracție sau al absorbției în UV, pentru realizarea unei curbe de distribuție simple. Totuși, pentru a putea asocia acestei curbe valorile maselor moleculare reale, este necesară etalonarea coloanei prin trecerea unui polimer cu masa moleculară cunoscută și, în cazul ideal, cu o structură cât mai apropiată, de exemplu diferiți polistireni standard. În general, se va obține o curbă Gauss; uneori, aceasta poate prezenta o asimetrie, pe partea maselor moleculare mici; axa verticală indică cantitatea (greutatea) speciilor de diferite mase moleculare eluate, iar pe axa orizontală, figurează logaritmul masei moleculare.

**▼B**

Conținutul în polimeri cu masă moleculară mică se deduce cu ajutorul acestei curbe. Calculul nu poate fi exact decât dacă speciile cu masă moleculară mică se comportă în același fel cu ansamblul polimerului, pe unitatea de masă.

#### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Reproductivitatea (deviația-standard relativă) a volumului de eluare trebuie să fie cel mult egală cu 0,3 %. Există modalități de ameliorare a reproductivității de analiză, grație unei corecții ce utilizează un standard intern, dacă un cromatograf este evaluat în funcție de timp și nu satisface criteriile menționate mai sus (a se vedea informațiile complementare la referința 1). Polidispersările depind de masele moleculare ale etaloanelor. În cazul polistirenului etalon, valorile tipice sunt:

|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| $M_p < 2\,000$              | $M_w/M_n < 1,20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1,05$ |
| $M_p > 10^6$                | $M_w/M_n < 1,20$ |

( $M_p$  este masa moleculară a etalonului, corespunzătoare semnalului maxim)

#### 1.6. DESCRIEREA METODEI

##### 1.6.1. Prepararea soluțiilor etalon de polistiren

Se vor dizolva polistirenii etalon, amestecând cu grijă până la diluția aleasă. Soluțiile se vor prepara ținând cont de recomandările fabricantului.

Concentrațiile etaloanelor alese depind de diferiți factori, cum ar fi: volumul de injecție, viscozitatea soluției și sensibilitatea detectorului. Volumul de injecție maxim trebuie să fie adaptat lungimii coloanei, având grijă să nu o supraîncarce. Volumele de injecție curente pentru separările analitice prin metoda cromatografică pe gel permeabil, pentru o coloană de 30 cm × 7,8 mm, variază de obicei între 40 și 100 μl. Se va determina raportul optim între volumul de injecție și concentrație, înainte de etalonarea coloanei.

##### 1.6.2. Prepararea soluțiilor de eșantion

În principiu, prepararea soluțiilor de eșantion se realizează în condiții identice. Eșantionul se dizolvă într-un solvent adecvat, de exemplu THF, agitând cu grijă. În niciun caz nu se va dizolva într-o baie cu ultrasunete. Dacă este necesar, soluția de probă se purifică cu ajutorul unui filtru cu membrană, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 0,2-2 μm.

Prezența particulelor nedizolvate trebuie menționată în raportul final, în măsura în care acestea pot rezulta din specii cu mase moleculare mari. Trebuie să se recurgă la o metodă potrivită pentru determinarea procentajului în greutate a particulelor nedizolvate. Analiza soluțiilor se va face în termen de 24 ore.

**▼B****1.6.3. Corecție legată de prezența impurităților și a aditivilor**

Fiind vorba despre conținutul în specii cu  $M < 1\,000$ , pentru care este necesar, în general, să se aplice o corecție care să țină cont de prezența compușilor particulari nepolimerici (cum ar fi impuritățile sau aditivii), cu excepția cazului în care conținutul măsurat nu depășește valoarea de 1 %. Această corecție se poate realiza prin analiza directă a soluției de polimer sau a eluatului pentru cromatografia pe gel permeabil.

În cazul în care eluatul este prea diluat pentru a permite analizarea, după traversarea coloanei, este necesar să fie concentrat. Va fi, eventual, necesară evaporarea soluției până la sec, urmată de redizolvare. Concentrarea soluției se va efectua astfel încât să nu intervină nicio modificare a compoziției. Tratamentul soluției, după faza cromatografiei pe gel permeabil, este funcție de metoda de analiză utilizată pentru determinarea cantitativă.

**1.6.4. Aparatură**

Un aparat pentru cromatografie pe gel permeabil este compus din următoarele elemente:

- un rezervor pentru solvent;
- un sistem pentru degazare (dacă este necesar);
- o pompă;
- un amortizor de impulsuri (dacă este necesar);
- un sistem de injecție;
- coloane cromatografice;
- un detector;
- un debitmetru (dacă este necesar);
- un sistem de înregistrare și tratare a datelor;
- un recipient pentru recuperarea soluțiilor utilizate.

Sistemul cromatografic pe gel permeabil trebuie să fie inert față de solventul utilizat (de exemplu, utilizarea capilarelor din oțel, atunci când solvent este THF).

**1.6.5. Injecția și sistemul de pompare a solventului**

Un volum definit din soluția de probă este injectat în coloană, într-o zonă bine definită, cu ajutorul unui aparat pentru eșantionare automată sau manuală. Dacă se operează manual, retragerea ori împingerea prea bruscă a pistonului seringii poate determina modificări în distribuția maselor moleculare observate. Este indicat ca sistemul de pompare a solventului să fie lipsit de pulsații; este de preferat ca acesta să includă un amortizor de impulsuri. Debitul este de ordinul a 1 ml/min.

**1.6.6. Coloana**

În funcție de natura eșantionului testat, polimerul se caracterizează făcând recurs la o singură coloană sau la mai multe coloane, conectate în serie. În comerț, sunt disponibile mai multe materiale poroase pentru coloane, cu proprietăți definite (de exemplu, dimensiunea porilor, limita de excludere). Alegerea unui gel de separare sau a lungimii de coloană depinde, pe de o parte, de proprietățile eșantionului testat (volum hidrocinamic, distribuția maselor moleculare) și, pe de altă parte, de condițiile particulare ale separării, cum ar fi: natura solventului, temperatura și debitul (1) (2) (3).

**▼B****1.6.7. Talere teoretice**

Coloana (sau combinația de coloane) utilizată pentru separare trebuie caracterizată prin numărul de talere teoretice. Pentru aceasta, în cazul în care solventul de eluare este THF, se trece o soluție de etilbenzen sau o altă substanță dizolvată nepolară potrivită, printr-o coloană de lungime cunoscută. Numărul de talere teoretice este dat de ecuația următoare:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{sau} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

unde:

$N$  = numărul de talere teoretice

$V_e$  = volumul de eluare, corespunzător semnalului maxim

$W$  = lățimea semnalului maxim, la nivelul liniei de bază

$W_{1/2}$  = lățimea semnalului maxim, la jumătatea înălțimii coloanei

**1.6.8. Eficacitatea separării**

În afară de numărul de talere teoretice, parametru determinant al lărgimii de bandă, eficacitatea de separare este o altă caracteristică importantă, determinată de panta curbei de calibrare. Eficacitatea de separare a unei coloane se calculează cu ajutorul relației următoare:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secțiunea coloanei}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

unde:

$V_{e, M_x}$  = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară  $M_x$ ;

$V_{e,(10.M_x)}$  = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară de 10 ori mai mare

Rezoluția sistemului este în general definită după cum urmează:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

unde:

$V_{e1}, V_{e2}$  = volumele de eluare ale celor doi polistireni standard la semnalul maxim

$W_1, W_2$  = lățimile vârfului la nivelul liniei bazei

$M_1, M_2$  = masele moleculare corespunzătoare semnalului maxim (aceste mase ar trebui să fie diferite printr-un factor 10)

Valoarea lui  $R$  pentru sistemul de coloane trebuie să fie superioară valorii de 1,7 (4).

**▼B****1.6.9. Solvenți**

Toți solvenții trebuie să aibă o mare puritate (se va folosi THF de puritate 99,5 %). Rezervorul pentru solvent (la nevoie, pus în atmosferă de gaz inert), trebuie să fie suficient de mare pentru a permite etalonarea coloanei și mai multe analize de eșantioane. Solventul va fi degazat înainte de a fi pompat în coloană.

**1.6.10. Reglarea temperaturii**

Temperatura componentelor interne critice (bucla de injecție, coloana sau coloanele, detectorul și tuburile) trebuie să fie constantă și compatibilă cu solventul ales.

**1.6.11. Detectorul**

Detectorul înregistrează în mod cantitativ concentrația eșantionului eluat din coloană. Pentru evitarea unei lărgimi nedorite a picului, volumul cuvei detectorului va fi ales cât mai mic posibil. Acesta nu trebuie să depășească 10  $\mu$ l, cu excepția detectoarelor ce funcționează prin difuzia luminii și a viscozimetrelor. În general, detecția se realizează prin refractometrie diferențială. Totuși, dacă proprietățile specifice ale eșantionului sau ale solventului pentru eluare o cer, se pot folosi alte tipuri de detectoare, cum ar fi cele UV/VIS sau IR, viscozimetrele etc.

**2. DATE ȘI RAPORT****2.1. DATE**

Se va face referință la normele DIN (1) pentru ceea ce privește criteriile de evaluare detaliate, la fel pentru specificațiile relative la colectarea și interpretarea datelor.

Pentru fiecare eșantion analizat, se vor realiza două experiențe independente. Rezultatele acestora se vor analiza separat.

Trebuie indicat în mod explicit că valorile măsurate sunt valori relative corespunzând unor echivalenți de masă moleculară ale standardului folosit.

În toate cazurile, este esențial să se determine și datele relative la blancuri, acestea fiind tratate în același mod ca eșantioanele.

După determinarea volumelor și a timpilor de retenție (eventual corectate cu ajutorul unui standard intern) se vor reprezenta grafic valorile  $\log M_p$  ( $M_p$  fiind semnalul maxim al polimerilor standard), în funcție de una dintre acele cantități. Sunt necesare cel puțin 2 puncte de etalonare pentru fiecare factor 10 de masă moleculară. Pentru trasarea întregii curbe sunt necesare cel puțin 5 puncte de măsură; această curbă va acoperi masa moleculară estimată a eșantionului. Punctul extrem al curbei de etalonare, spre partea maselor moleculare mici, se poate defini folosind n-hexilbenzenul sau altă substanță dizolvată nepolară adecvată. Se determină porțiunea de curbă corespunzătoare maselor moleculare mai mici de 1 000 și se va corecta, dacă va fi necesar, luând în considerare prezența impurităților și a aditivilor. În general, curbele de eluare sunt evaluate prin intermediul unui sistem de prelucrare informatică a datelor. Dacă s-a optat pentru o prelucrare manuală, este indicat să se consulte ASTM D 3536-91 (3).

**▼B**

Dacă un polimer insolubil este reținut în coloană, masa sa moleculară este, foarte probabil, superioară celei corespunzătoare fracțiunii solubile și trebuie ținut cont de aceasta, pentru a evita subestimarea conținutului în polimeri de masă moleculară mică. În apendice se află indicațiile ce permit corecția conținutului în polimeri de masă moleculară mică, luând în considerare polimerii insolubili.

Curba de distribuție va fi prezentată sub forma unui tabel sau a unui grafic (frecvența diferențială sau procentajele cumulative în funcție de  $\log M$ ). În cazul reprezentării grafice, o putere de 10 pentru masa moleculară corespunde în mod normal unei lățimi de aproximativ 4 cm, în vreme ce pentru maximul de semnal, este adecvată o înălțime de aproximativ 8 cm. În cazul curbelor de distribuție cumulative, diferența între 0 și 100 % pe axa ordonatei trebuie să fie în jur de 10 cm.

## 2.2. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare va cuprinde informațiile următoare:

### 2.2.1. Substanța testată:

- informații disponibile legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități);
- descrierea tratamentului aplicat eșantionului, observații, probleme.

### 2.2.2. Dispozitivul experimental:

- un rezervor pentru solvent, gaz inert, sistem pentru degazarea solventului, compoziția solventului, impurități;
- pompă, amortizor de impulsuri, sistem de injecție;
- coloane de separare (fabricant, toate precizările legate de caracteristicile coloanei, cum ar fi dimensiunea porilor, natura materialului de separare etc., numărul, lungimea și ordinul coloanelor utilizate);
- numărul de talere teoretice ale coloanei (sau al combinației de coloane), eficacitatea separării (resorbția sistemului);
- informații legate de simetria semnalelor maxime;
- temperatura coloanei, modul de reglare a temperaturii;
- detector (principiul de măsurare, tip, volumul cuvei);
- debitmetru, dacă există (fabricant, principiul de măsurare);
- sistemul utilizat pentru culegere și prelucrarea datelor (echipament și programe informatice).

### 2.2.3. Etalonarea sistemului:

- descrierea detaliată a metodei utilizate pentru determinarea curbei de etalonare;

**▼ B**

- precizări asupra criteriilor de calitate proprii acestei metode (de exemplu, coeficientul de corelare, eroarea pătratică medie etc.);
- informații asupra tuturor extrapolărilor, ipotezelor și aproximațiilor efectuate în cursul proceselor experimentale, precum și asupra evaluării și prelucrării datelor;
- toate măsurătorile efectuate pentru stabilirea curbei de etalonare trebuie prezentate sub forma unui tabel, care cuprinde, pentru fiecare punct de etalonare, următoarele informații:
  - denumirea eșantionului;
  - fabricantul eșantionului;
  - valorile caracteristice  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  ale etaloanelor furnizate de fabricant, deduse din măsurătorile ulterioare, completate de indicațiile legate de metoda de determinare;
  - volumul de injecție și concentrația substanței injectate;
  - valoarea de  $M_p$  utilizată pentru etalonare;
  - volumul de eluare sau timpul de retenție corectat, măsurat la semnalul maxim;
  - $M_p$  calculat la semnalul maxim;
  - procentajul de eroare la  $M_p$  calculat și la valoarea de etalonare.

**2.2.4. Informații asupra conținutului în polimeri cu masă moleculară mică:**

- descrierea metodelor de analiză utilizate și a modului în care au fost conduse experimentele;
- informații privind procentajul conținutului în specii de masă moleculară mică (greutate/greutate) în raport cu ansamblul eșantionului;
- informații legate de impurități, aditivi și alte substanțe nepoli-merice, în procentaj ponderal, funcție de ansamblul eșantionului;

**2.2.5. Evaluare:**

- evaluare în funcție de timp: toate metodele care vizează ameliorarea reproductivității cerute (metode de corecție, standard intern etc.);
- se precizează dacă evaluarea s-a efectuat plecând de la volumul de eluare sau de la timpul de retenție;
- se indică limitele de evaluare, dacă un pic nu a fost complet analizat;
- se descriu metodele de netezire, dacă s-au folosit;
- se indică procedeele de preparare și pretratare a eșantionului;
- dacă există, se indică prezența particulelor nedizolvate;



**▼B**

- se indică volumul de injecție (μl) și concentrația de injecție (mg/ml);
- se menționează observațiile privind efectele generatoare de deviații, în raport cu profilul ideal de cromatografie pe gel permeabil;
- se descriu în detaliu toate modificările aduse procedurilor de analiză;
- se precizează intervalele de eroare;
- se consemnează orice alte informații și observații utile pentru interpretarea rezultatelor.

**3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. DIN 55672 (1995), Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
3. ASTM D 3536-91, (1991), Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. ASTM D 5296-92, (1992), Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.



### Apendice

#### Indicații care permit corecția conținutului de polimeri cu masă moleculară mică, luând în considerare polimerii insolubili

Prezența unui polimer insolubil într-un eșantion antrenează o pierdere de masă în cursul analizei cromatografice pe gel permeabil. Polimerul insolubil este ireversibil reținut în coloană sau în filtrul eșantionului, atunci când partea solubilă a eșantionului traversează coloana. Dacă indicele de refracție diferențial ( $dn/dc$ ) al polimerului poate fi estimat sau măsurat, este posibilă estimarea masei pe care eșantionul a pierdut-o în coloană. În acest caz, se efectuează o corecție cu ajutorul unui etalonare extern al refractometrului, cu etaloane având concentrația și raportul  $dn/dc$ , cunoscute. În exemplul următor, s-a utilizat un etalon de poli(metacrilat de metil).

Etalonarea externă, practică în timpul analizei polimerilor acrilici, constă în analizarea cu ajutorul metodei cromatografice pe gel permeabil, a unei soluții etalon de poli(metacrilat de metil) în tetrahidrofuran, cu concentrația cunoscută; rezultatele servesc la calcularea constantei refractometrului, conform ecuației următoare:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

unde:

K = constanta refractometrului ( $\mu V \text{ sec/ml}$ )

R = răspunsul etalonului de polimetacrilat de metil ( $\mu V/\text{sec}$ )

C = concentrația etalonului de polimetacrilat de metil ( $\text{mg/ml}$ )

V = volumul de injecție ( $\text{ml}$ ) și

$dn/dc$  = indicele de refracție diferențial al unei soluții de polimetacrilat de metil în tetrahidrofuran ( $\text{ml/mg}$ )

Următoarele date caracterizează în general un etalon de polimetacrilat de metil:

R = 2 937 891

C = 1,07  $\text{mg/ml}$

V = 0,1  $\text{ml}$

$dn/dc$  =  $9 \times 10^{-5} \text{ ml/mg}$

Valoarea K rezultată,  $3,05 \times 10^{11}$ , este apoi utilizată pentru a calcula răspunsul teoretic al detectorului, adică ceea ce s-ar obține dacă 100 % din polimerul injectat s-ar alege la traversarea detectorului.

**▼B****A.20. COMPORTAMENTUL DE DIZOLVARE/EXTRACȚIE AL POLIMERILOR ÎN APĂ****1. METODĂ**

Metoda descrisă urmează Orientarea 120 (1997) a OCDE. Mai multe informații tehnice se găsesc în referințele bibliografice (1).

**1.1. INTRODUCERE**

În cazul anumitor polimeri, cum ar fi polimerii în emulsie, poate fi necesar un tratament inițial, înainte de utilizarea metodei expuse. Metoda nu este aplicabilă polimerilor lichizi, nici polimerilor care reacționează cu apa în condițiile experimentale.

Dacă este dificil sau imposibil să se pună în practică metoda, comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor poate fi studiat cu ajutorul altor metode. În acest caz, metoda utilizată va fi în întregime detaliată și justificată.

**1.2. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.3. PRINCIPIUL METODEI**

Comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor în mediu apos se determină prin metoda flaconului (a se vedea A.6 Solubilitatea în apă, metoda flaconului), căreia i se vor aduce modificările descrise mai jos.

**1.4. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.5. DESCRIEREA METODEI****1.5.1. Aparatură**

Aparatura necesară pentru aplicarea metodei este următoarea:

- un dispozitiv care permite măcinarea eșantionului până la obținerea unei pulberi, cum ar fi un concasor ce produce particule de dimensiuni determinate (1);
- un sistem de agitare, cu posibilitatea de reglare a temperaturii;
- un sistem de filtrare cu membrane;
- un dispozitiv de analiză;
- site standardizate.

**1.5.2. Prepararea soluției de eșantion**

Inițial trebuie măcinat un eșantion reprezentativ, până la dimensiuni ale particulelor cuprinse între 0,125 și 0,25 mm, utilizând sitele potrivite. Poate fi necesară o răcire pentru a garanta stabilitatea eșantionului sau pentru a se proceda la concasare. Materialele de tipul cauciucului pot fi pulverizate la temperatura azotului lichid (1).

Dacă nu este posibilă obținerea de particule la dimensiunile cerute, se vor reduce dimensiunile acestora cât mai mult posibil și se va consemna rezultatul. În cuprinsul raportului, este necesar să se indice modul în care eșantionul pulverizat a fost conservat înainte de analiză.

**▼B****1.5.3. Mod de operare**

Se cântăresc trei eșantioane din substanța testată, fiecare de 10 g, în trei recipiente prevăzute cu dop de sticlă și se adaugă câte 1 000 ml apă în fiecare recipient. Dacă manipularea a 10 g de polimer se dovedește imposibilă, este indicat să se folosească cea mai mare cantitate care poate fi manipulată; volumul de apă va fi mărit în mod proporțional.

Recipientele se vor închide bine, apoi se vor agita la temperatura de 20 °C. Se va folosi un dispozitiv de agitare care funcționează la temperatură constantă. După 24 ore, conținutul fiecărui recipient este centrifugat sau filtrat, iar concentrația polimerului în faza apoasă limpede va fi determinată cu ajutorul unei metode potrivite de analiză. Dacă nu există o metodă adecvată, care să permită o analiză în faza apoasă, se poate obține o estimare a solubilității/extractibilității totale, prin cântărirea, după uscare, a reziduului filtrat sau a precipitatului centrifugat.

De asemenea, este necesară diferențierea cantitativă a impurităților și aditivilor, pe de o parte, și a speciilor de masă moleculară mică, pe de altă parte. În cazul unei determinări gravimetrice, este important să se realizeze o analiză inițială, fără substanță de testare, în scopul de a lua în considerare reziduurile generate prin metoda experimentală.

În mod similar, se poate determina comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor în apă, la 37 °C, pentru pH 2 și pH 9, așa cum a fost descrisă experiența realizată la 20 °C. Valorile pH-ului pot fi obținute prin adăugare de soluții tampon adecvate sau adăugare de acizi ori baze, potriviți; dintre aceștia, se pot enumera: acid clorhidric, acid acetic, hidroxizi de sodiu și de potasiu de calitate analitică sau amoniac.

Trebuie realizate una sau două experiențe, conform metodei. În cazul în care sunt disponibile metode suficient de specifice, pentru analizarea directă a polimerului în faza apoasă, un experiment ca acela descris mai sus este destul. Însă, atunci când aceste metode nu există, iar determinarea comportamentului de dizolvare-extracție al polimerului, nu se poate face decât indirect – respectiv prin determinarea conținutului în carbon organic total (COT) al extractului apos – este necesară o experiență suplimentară. De asemenea, și aceasta se va face în triplicat, cu eșantioane de polimer de 10 ori mai mici și cu aceleași cantități de apă, ca și la primul experiment.

**1.5.4. Analiza****1.5.4.1. Experimente realizate cu eșantioane de dimensiuni unice**

Este posibil să dispunem de metode care permit o analiză directă a polimerilor, în fază apoasă. În caz contrar, poate fi luată în considerare analiza indirectă a polimerilor dizolvați sau extrași. Pentru aceasta, se va determina conținutul total în părți solubile, care se va corecta ținând cont de substanțele nepolimerice.

Pentru a determina conținutul total în specii polimerice, analiza extrasului apos poate realiza:

fie printr-o metodă suficient de sensibilă, de exemplu:

— determinarea COT cu persulfat sau dicromat, pentru a se obține CO<sub>2</sub>, urmată de o estimare prin IR sau de o analiză chimică;

**▼B**

— spectrometria de absorbție atomică (SAA) sau echivalentul acesteia, emisie în plasmă cuplată prin inducție (PCI);, în cazul polimerilor ce conțin siliciu sau un metal;

— absorbția UV sau spectrofluorimetria pentru polimerii arilici;

— cromatografia în fază lichidă cuplată cu spectrometria de masă, pentru eșantioane cu mase moleculare mici,

fie prin evaporare completă, în vid, a extrasului apos, urmată de o analiză a rezidului prin spectroscopie (IR, UV etc.) sau prin SAA-PCI.

Dacă o astfel de analiză a fazei apoase este imposibilă, extrasul apos se va obține cu ajutorul unui solvent organic nemiscibil în apă (o hidrocarbură clorurată, de exemplu). Apoi, solventul este evaporat și reziduul se analizează (prin IR, UV sau SAA-PCI), pentru determinarea conținutului său în polimer specificat. Toți constituenții acestui reziduu care se dovedesc a fi impurități sau aditivi trebuie separați, în scopul determinării gradului de dizolvare/extracție al polimerului.

Atunci când astfel de substanțe sunt prezente în cantități relativ importante, poate fi necesară supunerea rezidului unei analize cromatografice în fază lichidă, de înaltă performanță, sau în fază gazoasă, de exemplu, în scopul diferențierii acelor impurități prezente, de monomeri și derivați monomerici, astfel încât conținutul real în aceste ultime specii, să poată fi determinat.

În anumite cazuri, o simplă evaporare completă a solventului organic, urmată de cântărirea rezidului uscat, poate fi suficientă.

#### 1.5.4.2. *Experimente realizate cu două eșantioane de mărimi diferite*

Conținutul în carbon organic total trebuie determinat pentru toate extrasele apoase.

Se realizează o determinare prin gravimetrie, asupra părții nedizolvate sau neextrase a eșantionului. Dacă, după centrifugarea sau filtrarea conținutului fiecărui recipient, reziduul de polimer aderă încă la perețele recipientului, trebuie clătit respectivul recipient cu filtratul, până când nu se mai observă urme de reziduu. După aceea, filtratul este refiltrat sau centrifugat. Reziduurile depuse pe filtru sau în tubul centrifugei sunt uscate la 40 °C, în vid, apoi se cântăresc. Se va continua uscarea, până la obținerea unei mase constante.

## 2. **DATE**

### 2.1. EXPERIMENTE REALIZATE CU EȘANTIOANE DE DIMENSIUNI UNICE

Rezultatele obținute pentru fiecare dintre cele trei flacoane, precum și valorile medii, trebuie consemnate și exprimate în unități de masă per volum de soluție (în general, în mg/l) sau în unități de masă per masă de eșantion de polimer (de obicei, în mg/g). În plus, pierderea de masă de eșantion (calculată prin raportarea masei soluției la masa inițială de eșantion), va fi de asemenea menționată. Trebuie calculate deviațiile standard relative. Diversele valori vor fi menționate o dată, pentru produsul total (polimer + principalii aditivi etc.) și repetate, pentru polimerul singur (pentru a cunoaște, după separare, mărimea relativă a respectivilor aditivi).

**▼B****2.2. EXPERIMENTE REALIZATE CU EȘANTIOANE DE DIMENSIUNI DIFERITE**

Diferitele concentrații ale carbonului organic total în extrasele apoase, provenite din cele două serii a câte trei experiențe, precum și valorile medii pentru fiecare serie, trebuie consemnate și exprimate în unități de masă per volum de soluție (în general, în mgC/l), precum și în unități de masă per masă de eșantion inițial (de obicei, în mgC/g).

Dacă nu există diferențe între rezultatele corespunzătoare rapoartelor dimensiune de eșantion/volum de apă mare sau mic, aceasta poate semnifica faptul că toți constituenții susceptibili a fi extrași, au fost efectiv extrași. În acest caz, o analiză directă nu este, de regulă, necesară.

Diferitele mase de reziduu trebuie consemnate și exprimate în procente de masă inițială de eșantion. Se vor calcula valori medii pentru fiecare experiență. Diferența dintre 100 și procentajul obținut, reprezintă procentul de materii solubile și extractibile din eșantioanele inițiale.

**3. RAPORT****3.1. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

**3.1.1. Substanța testată:**

— informații disponibile, legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități, proporția speciilor cu masă moleculară mică).

**3.1.2. Condiții experimentale:**

— descrierea metodelor utilizate și a condițiilor experimentale;

— descrierea metodelor de analiză și detecție.

**3.1.3. Rezultate:**

— rezultate de solubilitate/extractibilitate în mg/l: toate valorile și valorile medii obținute pentru experiențele de extracție în diferite soluții, repartizate în polimeri și impurități, aditivi etc.;

— rezultate de solubilitate/extractibilitate în mg/g de polimer;

— concentrațiile carbonului organic total în extracțele apoase, masa soluției și procentajele calculate, dacă s-a făcut măsurarea;

— pH-ul fiecărui eșantion;

— informații privind valorile obținute în experiențele martor (fără solvent);

— descrierea metodelor de analiză și detecție;

— dacă este necesar, se va menționa instabilitatea chimică a substanței testate, în cursul procedurii experimentale și în cursul analizei;

— toate informațiile importante pentru interpretarea rezultatelor.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffergezeugnissen für Prüfzwecke.

**▼B****A.21. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (LICHIDE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Această metodă de testare este concepută pentru a măsura potențialul unei substanțe lichide de a crește rata sau intensitatea arderii unei substanțe combustibile sau de a forma cu o substanță combustibilă un amestec care se aprinde spontan când cele două se amestecă omogen. Se bazează pe testul ONU pentru lichide oxidante (1) și este echivalent cu acesta. Cu toate acestea, întrucât această metodă A.21 este concepută în special pentru a îndeplini cerințele Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, este necesară comparația cu o singură substanță de referință. Testarea și comparația cu alte substanțe de referință pot fi necesare în cazul în care se estimează utilizarea rezultatelor în alte scopuri (1).

Nu este necesar să se efectueze acest test în cazul în care examinarea formulei structurale stabilește indubitabil că substanța este incapabilă să reacționeze exotermic cu un material combustibil.

Înainte de efectuarea testului este util să se cunoască informații privind orice potențiale proprietăți explozive ale substanței.

Acest test nu se aplică substanțelor solide, gazoase, explozive sau foarte inflamabile sau peroxizilor organici.

Nu este necesar să se efectueze acest test în cazul în care sunt disponibile rezultatele pentru substanța de testat în cadrul testului ONU pentru lichide oxidante (1).

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Timpul mediu de creștere a presiunii reprezintă media timpilor măsurați în care un amestec testat produce o creștere de presiune de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică.

**1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ**

Ca substanță de referință se utilizează o soluție apoasă de acid azotic (calitate analitică) la 65 % (g/g) (2).

(1) Ca de exemplu în cadrul reglementărilor privind transportul.

(2) Înainte de testare, acidul trebuie titrat pentru a se confirma concentrația.

**▼B**

Opțional, dacă experimentatorul prevede că rezultatele acestui test ar putea fi utilizate în alte scopuri, ar putea fi oportună testarea altor substanțe de referință <sup>(1)</sup>.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Lichidul care urmează a fi testat se amestecă, în proporție masică de 1 la 1 cu celuloză fibroasă și se introduce într-un vas de presiune. Dacă în timpul amestecării sau umplerii are loc combustia spontană, nu mai sunt necesare alte teste.

Dacă nu intervine combustia spontană, se efectuează testul complet. Amestecul se încălzește într-un vas de presiune și se măsoară timpul mediu de creștere a presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică. Acesta este comparat cu timpul mediu de creștere a presiunii pentru amestecul de substanță sau substanțe de referință și celuloză în proporție de 1:1.

#### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Dintr-o serie de cinci teste asupra unei singure substanțe, rezultatele nu trebuie să prezinte diferențe de peste 30 % față de media aritmetică. Rezultatele care se abat cu peste 30 % de la medie se ignoră, se îmbunătățește procedura de amestecare și umplere și se repetă testele.

#### 1.6. DESCRIEREA METODEI

##### 1.6.1. Pregătire

##### 1.6.1.1. Substanța combustibilă

Ca material combustibil se utilizează celuloză fibroasă uscată, cu fibre de o lungime între 50 și 250  $\mu\text{m}$  și un diametru mediu de 25  $\mu\text{m}$  <sup>(2)</sup>. Celuloza se usucă până la obținerea unei greutate constante în straturi de maximum 25 mm grosime, la 105 °C timp de patru ore, după care se păstrează într-un exsicator, în prezența unui deshidratant, până la răcire și utilizare. Conținutul de apă al celulozei uscate trebuie să fie sub 0,5 % din masa uscată <sup>(3)</sup>. Dacă este necesar, timpul de uscare se prelungește pentru îndeplinirea acestei condiții <sup>(4)</sup>. Pe întreg parcursul testului se utilizează același lot de celuloză.

<sup>(1)</sup> De exemplu: acid percloric 50 % (g/g) și clorat de sodiu 40 % (g/g) se utilizează în referința 1.

<sup>(2)</sup> De exemplu, pudră de celuloză Whatman pentru cromatografie pe coloană CF11, nr. de catalog 4021 050.

<sup>(3)</sup> Confirmat prin (de exemplu) titrare Karl-Fisher.

<sup>(4)</sup> Alternativ, acest conținut de apă poate fi realizat prin (de exemplu) încălzire la 105 °C sub vid, timp de 24 h.



**▼B**1.6.1.2. *Aparatură*

## 1.6.1.2.1. Vas de presiune

Este necesar un vas de presiune. Vasul este format dintr-un vas de presiune cilindric, din oțel, cu o lungime de 89 mm și un diametru exterior de 60 mm (a se vedea figura 1). În două puncte diametral opuse se formează două suprafețe plane (care reduc secțiunea transversală a vasului la 50 mm) care permit fixarea sa în momentul instalării dopului de aprindere și a dopului de aerisire. Vasul, care are un alezaj cu un diametru de 20 mm, este fălțuit intern la ambele capete pe o adâncime de 19 mm și filetat pentru fileturi de 1" conform British Standard Pipe (BSP) sau echivalent metric. O priză de presiune, sub forma unui braț lateral, este înfiletată pe fața curbată a vasului de presiune la 35 de mm de unul dintre capete și la 90° față de suprafețele plane. Orificiul pentru priză este alezat la o adâncime de 12 mm și filetat pentru fileturi de 1/2" BSP (sau echivalent metric) la extremitatea brațului lateral. Dacă este necesar, pentru a asigura etanșeitățile la gaz, se folosește o garnitură inertă. Brațul lateral se extinde 55 mm de la corpul vasului de presiune și are un alezaj de 6 mm. Extremitatea brațului lateral este fălțuită și filetată pentru un traductor de presiune de tip diafragmă. Se poate utiliza orice dispozitiv de măsurare a presiunii care nu este afectat de gazele calde sau de produsele de descompunere și care poate reacționa la o creștere de presiune de la 690 la 2 070 kPa în cel mult 5 ms.

Extremitatea vasului de presiune cea mai îndepărtată de brațul lateral este închisă cu un dop de aprindere prevăzut cu doi electrozi, unul izolat de corpul dopului, iar celălalt pus la masă. Cealaltă extremitate a vasului de presiune este închisă cu un disc de rupere (presiunea de rupere aproximativ 2 200 kPa), fixat cu un dop de fixare având un orificiu de 20 mm. Dacă este necesar, dopul de aprindere se montează cu o garnitură inertă pentru a asigura etanșeitățile la gaz. În timpul utilizării, ansamblul este menținut în poziția corectă de un stand de sprijin (figura 2). Acesta cuprinde, de obicei, o placă de bază din oțel moale de 235 mm × 184 mm × 6 mm și un tub cu secțiune pătrată de 70 mm × 70 mm × 4 mm de 185 mm lungime.

La una dintre extremitățile tubului cu secțiune pătrată, se taie câte o secțiune de fiecare parte, astfel încât să se obțină o structură cu secțiune pătrată de 86 mm lungime cu două picioare plate. Capetele acestor picioare pătrate se taie într-un unghi de 60° față de orizontală și sudate pe placa de bază. Pe o parte a capătului superior al secțiunii de bază se decupează o fantă de 22 mm lățime și 46 mm adâncime, astfel încât, atunci când ansamblul vasului de presiune este pus pe suport, cu dopul de aprindere în jos, brațul lateral să intre în fantă. O piesă de oțel de 30 mm lățime și 6 mm grosime se sudează pe fața interioară a părții inferioare a tubului cu secțiune pătrată, pentru a acționa ca distanțier. Două șuruburi cu cap fluture de 7 mm, fixate pe partea opusă, mențin vasul de presiune într-o poziție fixă. Două benzi de 12 mm lățime din tablă de oțel de 6 mm grosime, sudate pe părțile laterale de la baza tubului cu secțiune pătrată, sprijină vasul de presiune de dedesubt.

**▼B****1.6.1.2.2. Sistemul de aprindere**

Sistemul de aprindere este format dintr-o sârmă de Ni/Cr cu o lungime de 25 cm, un diametru de 0,6 mm și o rezistență de 3,85 ohm/m. Sârma se înfășoară, pe o tijă cu un diametru de 5 mm, sub forma unei bobine, și se leagă la electrozii dopului de aprindere. Bobina trebuie să aibă una dintre configurațiile prezentate în figura 3. Distanța dintre fundul vasului și partea inferioară a bobinei de aprindere trebuie să fie de 20 mm. Dacă electrozii nu pot fi reglați, secțiunile sârmei de aprindere dintre bobină și fundul vasului se izolează cu o manta ceramică. Sârma este încălzită de o sursă de alimentare constantă care poate asigura cel puțin 10 A.

**1.6.2. Desfășurarea testului <sup>(1)</sup>**

Aparatul, echipat complet cu traductor de presiune și sistem de încălzire, dar fără discul de rupere, se sprijină vertical, cu dopul de aprindere în jos. Se amestecă 2,5 g din lichidul de testat cu 2,5 g de celuloză uscată într-un pahar de laborator cu un agitator de sticlă <sup>(2)</sup>. Pentru siguranță, în timpul amestecării între operator și amestec se amplasează un ecran de protecție. Dacă amestecul se aprinde în timpul amestecării sau umplerii, nu mai sunt necesare teste suplimentare. Amestecul se adaugă, în cantități mici, lovindu-l încet de container, în vasul de presiune, asigurându-se că nu există spații goale în jurul bobinei de aprindere și că amestecul este în contact perfect cu aceasta. Este important ca bobina să nu fie deformată în procesul de umplere, întrucât acest lucru ar putea conduce la rezultate eronate <sup>(3)</sup>. Discul de rupere se pune pe poziție și dopul de fixare se înșurubează strâns. Vasul umplut se pune, cu discul de rupere în sus, pe suportul de sprijin pentru încălzire care se amplasează într-o hotă sau o cameră de tiraj adecvată. Se conectează sursa de alimentare la bornele externe ale dopului de aprindere și se aplică un curent de 10 A. De la începerea amestecării și până la punerea sub tensiune nu trebuie să treacă mai mult de 10 minute.

Semnalul produs de traductorul de presiune se înregistrează într-un sistem adecvat care permite atât evaluarea, cât și generarea unei înregistrări permanente a graficului presiune/timp obținut (de exemplu un înregistrator de semnale tranzitorii legat la un înregistrator cu bandă). Amestecul se încălzește până când se rupe discul de rupere sau cel puțin 60 s. Dacă discul de rupere nu se rupe, amestecul se lasă să se răcească, după care se dezmembrează cu atenție aparatul, luând măsurile necesare pentru a ține seama de eventuala presurizare. Se fac cinci teste cu substanța de testat și substanța sau substanțele de referință. Se notează timpul necesar pentru creșterea presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică. Se calculează timpul mediu de creștere a presiunii.

În unele cazuri, substanțele pot genera o creștere de presiune (prea mare sau prea mică), cauzată de reacții chimice care nu caracterizează proprietățile oxidante ale substanței. În aceste cazuri, este posibil să fie necesară repetarea testului cu o substanță inertă, de exemplu diatomit (kieselgur), în loc de celuloză, pentru a se clarifica natura reacției.

<sup>(1)</sup> Amestecurile de oxidanți cu celuloză trebuie tratate ca fiind potențial explozive și manipulate cu atenția cuvenită.

<sup>(2)</sup> În practică, acest lucru se poate realiza prin prepararea unui amestec 1:1 din lichidul de testat și celuloză, într-o cantitate mai mare decât cea necesară pentru test și mutând  $5 \pm 0,1$  g în vasul de presiune. Amestecul trebuie să fie proaspăt preparat pentru fiecare testare.

<sup>(3)</sup> Trebuie să se evite, în special, contactul dintre spirele adiacente ale bobinei.

**▼B****2. DATE**

Timpii de creștere a presiunii atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța (substanțele) de referință. Timpii de creștere a presiunii pentru testele cu o substanță inertă, dacă se efectuează astfel de teste.

**2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se calculează timpii medii de creștere a presiunii atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța sau substanțele de referință.

Se calculează timpul mediu de creștere a presiunii pentru testele cu o substanță inertă (dacă se efectuează).

Tabelul 1 prezintă câteva exemple de rezultate.

*Tabelul 1*

**Exemple de rezultate <sup>(a)</sup>**

| Substanța <sup>(b)</sup>                       | Timpul mediu de creștere a presiunii pentru un amestec 1:1 cu celuloză (ms) |
|--|---|
| Dicromat de amoniu, soluție apoasă saturată    | 20 800  |
| Nitrat de calciu, soluție apoasă saturată      | 6 700   |
| Nitrat feric, soluție apoasă saturată          | 4 133   |
| Perclorat de litiu, soluție apoasă saturată    | 1 686   |
| Perclorat de magneziu, soluție apoasă saturată | 777   |
| Nitrat de nichel, soluție apoasă saturată      | 6 250   |
| Acid azotic, 65 %                              | 4 767 <sup>(c)</sup>  |
| Acid percloric, 50 %                           | 121 <sup>(c)</sup>  |
| Acid percloric, 55 %                           | 59  |
| Nitrat de potasiu, soluție apoasă 30 %         | 26 690  |
| Nitrat de argint, soluție apoasă saturată      | <sup>(d)</sup>  |
| Clorat de sodiu, soluție apoasă 40 %           | 2 555 <sup>(c)</sup>  |
| Nitrat de sodiu, soluție apoasă 45 %           | 4 133   |
| <i>Substanță inertă</i>                        |   |
| Apă:celuloză                                   | <sup>(d)</sup>  |

<sup>(a)</sup> A se vedea referința 1 pentru clasificarea conform regimului de transport ONU.

<sup>(b)</sup> Soluțiile saturate se prepară la 20 °C.

<sup>(c)</sup> Valoarea medie obținută la teste comparative interlaboratoare.

<sup>(d)</sup> Presiunea maximă de 2 070 kPa nu a fost atinsă.

**▼B****3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

- identitatea, puritatea, compoziția, puritatea etc. substanței de testat;
- concentrația substanței de testat;
- procedura de uscare a celulozei utilizate;
- conținutul de apă al celulozei utilizate;
- rezultatele măsurărilor;
- rezultatele testelor cu o substanță inertă, dacă este cazul;
- timpii medii de creștere a presiunii calculați;
- orice abatere de la această metodă și motivele acesteia;
- orice informații și observații suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

**3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR <sup>(1)</sup>**

Rezultatele testelor se evaluează în funcție de:

- (a) eventuala combustie spontană a amestecului de substanță de testat și celuloză; și
- (b) compararea timpului mediu necesar pentru creșterea presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa cu cel al substanței (substanțelor) de referință.

O substanță lichidă este considerată oxidant dacă:

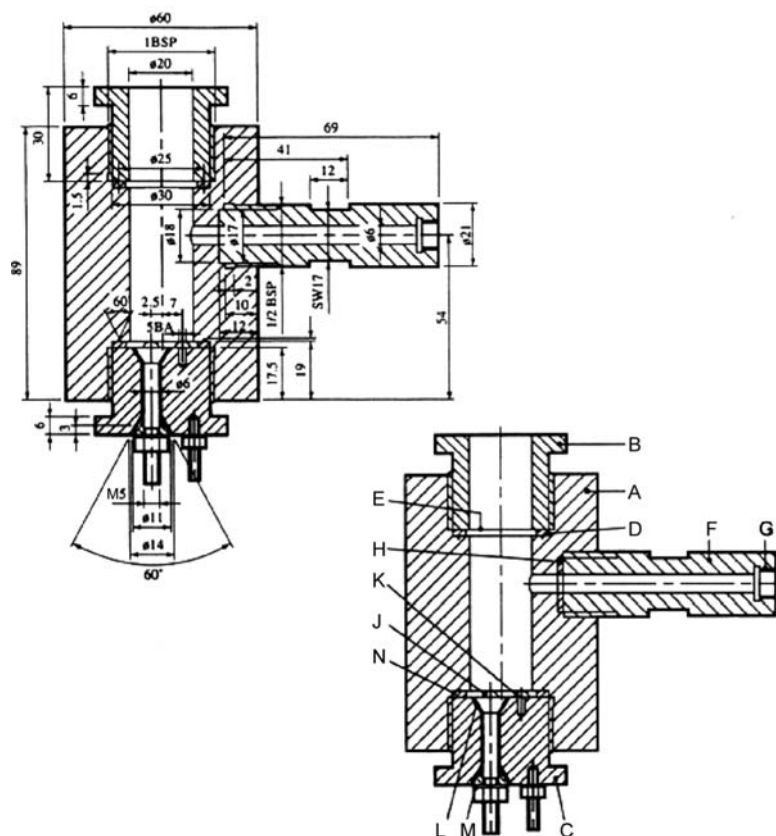
- (a) un amestec de substanță de testat și celuloză în proporție masică de 1:1 se aprinde spontan; sau
- (b) un amestec de substanță de testat și celuloză în proporție masică de 1:1 are un timp mediu de creștere a presiunii mai mic sau egal cu cel al unui amestec de acid azotic în soluție apoasă de 65 % (g/g) și celuloză în proporție masică de 1:1.

Dacă este necesar pentru a evita un rezultat pozitiv fals, la interpretarea rezultatelor se iau în considerare și rezultatele obținute la testarea substanței cu un material inert.

<sup>(1)</sup> A se vedea referința 1 pentru interpretarea rezultatelor conform reglementărilor ONU privind transportul utilizând mai multe substanțe de referință.

Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3<sup>rd</sup> revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

### Vas de presiune



- |                                       |                                  |                      |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| (A) Corpul vasului de presiune        | (B) Dop de fixare disc de rupere | (C) Dop de aprindere |
| (D) Șaibă din plumb moale             | (E) Disc de rupere               | (F) Braț lateral     |
| (G) Cap traductor de presiune         | (H) Șaibă                        | (J) Electrode izolat |
| (K) Electrode pus la masă             | (L) Izolație                     | (M) Con de oțel      |
| (N) Canelură de deformare a<br>șaipei |                                  |                      |

▼ B

Figura 2

Stand de sprijin

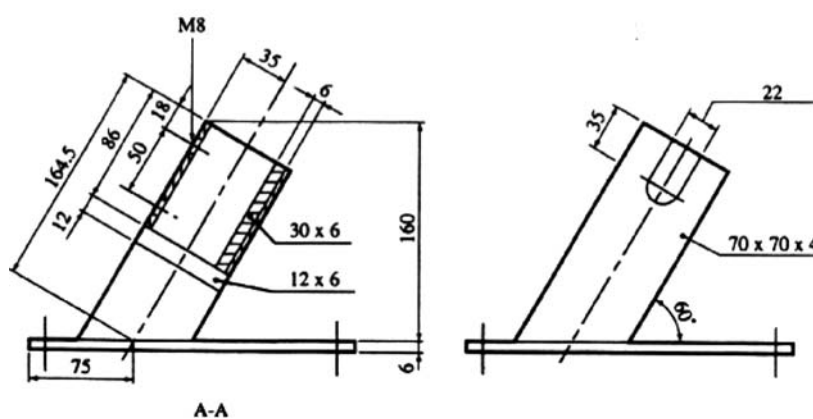
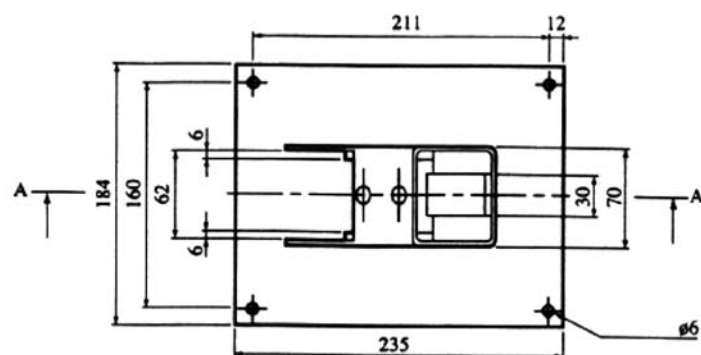


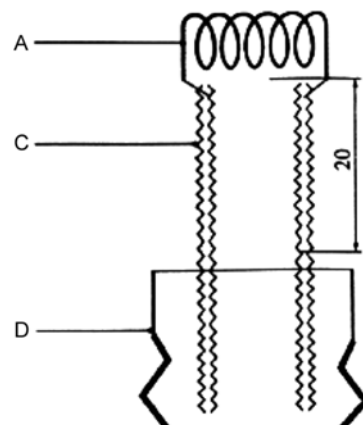
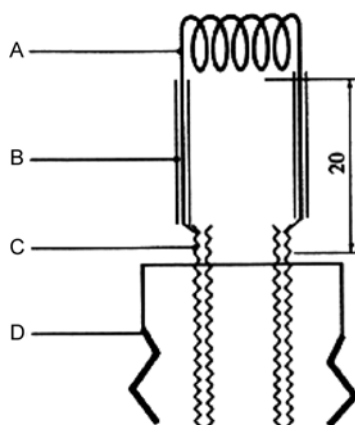
Figura 3

Sistemul de aprindere

(A) Bobină de  
aprindere

(B) Izolație

(C) Electrozi

(D) Dop de  
aprindere

Notă: se poate folosi oricare dintre aceste configurații.

▼ **M1****A.22. DIAMETRU MEDIU GEOMETRIC PONDERAT PE LUNGIME AL FIBRELOR****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Această metodă descrie procedura de măsurare a diametrului mediu geometric ponderat pe lungime (LWGMD) al Fibrelor Minerale Artificiale (FMA) în vrac. În măsura în care LWGMD al populației are o probabilitate de 95 % de a fi cuprins între limitele de încredere la 95 % ( $LWGMD \pm$  două erori standard) din eșantion, valoarea raportată (rezultatul testării) va fi limita de încredere inferioară procentului de 95 % din eșantion (adică  $LWGMD - 2$  erori standard). Această metodă se bazează pe actualizarea (iunie 1994) unui proiect de procedură industrială a HSE asupra căruia s-a convenit cu ocazia unei reuniuni între ECFIA și HSE, care a avut loc la Chester la 26 septembrie 1993, și care a fost elaborat pentru și pe baza unui al doilea test interlaboratoare (1, 2). Această metodă de măsurare poate fi utilizată pentru a caracteriza diametrul fibrelor care intră în alcătuirea substanțelor sau a produselor în vrac ce conțin FMA-uri, inclusiv fibre ceramice refractare (FCR), fibre vitroase artificiale (FVA), fibre cristaline și policristaline.

Ponderarea pe lungime reprezintă o metodă de compensare a efectelor asupra distribuției diametrului cauzate de spargerea fibrelor lungi în timpul eșantionării sau manipulării materialului. Statistica geometrică (media geometrică) este utilizată pentru a măsura distribuția diametrelor FMA-urilor, având în vedere că distribuțiile acestor diametre sunt în general apropiate de distribuția log-normală.

Măsurarea lungimii și a diametrului este o operațiune fastidioasă și de durată, însă, dacă se măsoară doar acele fibre care intră în contact cu o linie infinit de subțire a câmpului vizual al unui MEB (microscop electronic cu baleiaj), atunci probabilitatea de a selecționa o fibră dată este proporțională cu lungimea sa. Având în vedere că această metodă ia în considerare lungimea la efectuarea calculelor de ponderare pe lungime, singura măsurătoare necesară este diametrul și LWGMD-2SE poate fi calculat conform descrierii.

**1.2. DEFINIȚII**

**Particulă:** Un obiect al cărui raport lungime/lățime este mai mic de 3:1.

**Fibră:** Un obiect al cărui raport lungime/lățime (raport de aspect) este de cel puțin 3:1.

**1.3. DOMENIUL ȘI LIMITELE DE APLICARE**

Metoda este concepută pentru a analiza distribuția diametrelor având un diametru mediu cuprins între 0,5  $\mu\text{m}$  și 6  $\mu\text{m}$ . Diametrele mai mari pot fi măsurate cu ajutorul unor grosimente inferioare ale MEB, însă această metodă va fi din ce în ce mai limitată, pe măsură ce distribuțiile fibrelor devin mai fine. În această situație, se recomandă efectuarea de măsurători cu ajutorul unui microscop electronic cu transmisie (MET), dacă diametrul mediu este mai mic de 0,5  $\mu\text{m}$ .

▼ **M1**

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Un număr de eşantioane reprezentative sunt prelevate din fibre de ţesătură sau din fibre destrămate în vrac. Lungimea fibrelor în vrac este redusă printr-o procedură de zdrobire, apoi se dispersează în apă un subeşantion reprezentativ. Un număr de alicote sunt extrase şi filtrate cu ajutorul unui filtru din polycarbonat cu un diametru al porilor de 0,2 µm, înainte de a fi pregătite spre examinare cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronică cu baleiaj (MEB). Diametrele fibrelor sunt măsurate utilizându-se un grosisment al ecranului de cel puţin  $\times 10\,000$ <sup>(1)</sup> cu ajutorul unei eşantionări liniare, astfel încât să se obţină o estimare imparţială a diametrului mediu. Intervalul de încredere mai mic de 95 % (bazat pe un test unilateral) se calculează pentru a obţine o estimare a valorii minime a diametrului mediu geometric al fibrelor materialului.

## 1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.5.1. Siguranţă/precauţii

Este necesar să se reducă la minimum expunerea personalului la fibre în suspensie în atmosferă, precum şi să se utilizeze o hotă sau o cutie cu mănuşi în timpul manipulării fibrelor. Trebuie efectuate controale periodice privind expunerea personalului, pentru a determina eficacitatea metodelor de control. În timpul manipulării FMA-urilor, personalul trebuie să poarte mănuşi de unică folosinţă pentru a reduce iritaţia pielii şi pentru a preveni contaminarea încrucişată.

## 1.5.2. Aparatură/echipamente

- Prese şi matriţe (capabile să producă 10 MPa).
- Filtre din polycarbonat cu pori capilari de 0,2 µm (diametru de 25 mm).
- Filtru din membrană de ester de celuloză cu pori de 5 µm destinat utilizării ca filtru secundar.
- Aparat de filtrare din sticlă (sau sisteme de filtrare de unică folosinţă) concepute pentru filtre cu diametrul de 25 mm (de exemplu trusă de microanaliză din sticlă Millipore, tip nr. XX10 025 00).
- Apă proaspăt distilată şi filtrată cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,2 µm pentru îndepărtarea microorganismelor.
- Pulverizator catodic cu anticatod din aur sau din aur/paladiu.
- Microscop electronic cu baleiaj cu o rezoluţie capabilă să coboare până la 10 nm şi să funcţioneze la un grosisment de  $\times 10\,000$ .
- Diverse: spatule, lamă de scalpel de tip 24, pensete, tuburi MEB, adeziv sau bandă adezivă cu carbon, argint coloidal.
- Sondă cu ultrasunete sau baie de ultrasunete de laborator.
- Prelevator sau sondă, pentru prelevarea de eşantioane din ţesătura de FMA.

<sup>(1)</sup> Această valoare de grosisment este indicată pentru fibrele de 3 µm. Pentru fibrele de 6 µm, un grosisment de  $\times 5\,000$  poate fi mai potrivit.



▼ **M1**1.5.3. **Procedura de testare**1.5.3.1. *Eșantionare*

Pentru țesături și plăci, se utilizează un prelevator sau o sondă de 25 mm pentru prelevarea de eșantioane din secțiunea transversală. Prelevările trebuie să fie efectuate la intervale identice pe toată lățimea unei mici lungimi din țesătură sau să fie colectate din zone aleatorii, dacă sunt disponibile lungimi mari ale țesăturii. Același echipament poate fi utilizat pentru a preleva eșantioane aleatorii din fibre destrămate. Dacă este posibil, trebuie prelevate șase eșantioane, pentru a reflecta variațiile spațiale din materialul în vrac.

Cele șase eșantioane trebuie zdrobite într-o matriță cu un diametru de 50 mm la 10 MPa. Materialul trebuie amestecat cu spatula și presat din nou la 10 MPa. Materialul este apoi îndepărtat din matriță și depozitat într-o sticlă închisă ermetic.

1.5.3.2. *Pregătirea eșantionului*

Dacă este necesar, lianții organici pot fi eliminați prin introducerea fibrei într-un cuptor la 450 °C timp de aproximativ o oră.

Se recomandă utilizarea conurilor pentru delimitare și împărțirea în sferturi pentru a subdivide eșantionul (această operațiune trebuie efectuată în interiorul unei incinte cu pulberi).

Cu ajutorul unei spatule, adăugați o cantitate mică (< 0,5 g) din eșantion în 100 ml de apă proaspăt distilată care a fost filtrată printr-un filtru cu membrană de 0,2 μm (pot fi utilizate și alte surse de apă ultra pură, cu condiția ca acestea să fie de o calitate satisfăcătoare). Dispersați atent cu ajutorul unei sonde cu ultrasunete care funcționează la 100 W și care este reglată pentru a produce cavitație. (Dacă nu dispuneți de o sondă, utilizați următoarea metodă: agitați și răsturnați de mai multe ori, timp de 30 de secunde; lansați ultrasunete într-o baie cu ultrasunete de laborator timp de cinci minute; apoi agitați și răsturnați de mai multe ori, timp de alte 30 de secunde.)

Imediat după dispersia fibrei, îndepărtați un anumit număr de alicote (de exemplu trei alicote de 3, 6 și 10 ml) utilizând o pipetă cu gură largă (cu o capacitate de 2-5 ml).

Filtrați sub vid fiecare alicotă cu ajutorul unui filtru din policarbonat de 0,2 μm susținut de un filtru secundar MEC cu pori de 5 μm, utilizând o pâlnie de filtrare din sticlă de 25 mm cu un rezervor cilindric. O cantitate de aproximativ 5 ml de apă distilată filtrată trebuie introdusă în pâlnie, urmând ca alicota să fie pipetată încet în apă, menținând totodată vârful pipetei sub menisc. Pipeta și rezervorul trebuie clătite bine după pipetare, deoarece fibrele fine au tendința de a se localiza mai ales la suprafață.

Îndepărtați atent filtrul și separați-l de filtrul secundar înainte de a-l depune într-un recipient pentru a se usca.

▼ **M1**

Decupați un sfert sau o jumătate din secțiunea de depozit filtrat cu o lamă de scalpel de tip 24 printr-o mișcare oscilatorie. Fixați atent secțiunea decupată pe placa unui MEB cu ajutorul unui bandă adezive sau al unui adeziv cu carbon. Argintul coloidal trebuie aplicat în cel puțin trei poziții diferite pentru a îmbunătăți contactul electric la marginile filtrului și ale plăcii. După uscarea lipiciului/argintului coloidal, pulverizați catodic aproximativ 50 nm de aur sau de aur/paladiu pe suprafața depozitului.

1.5.3.3. *Calibrarea și funcționarea MEB*

## 1.5.3.3.1. Calibrarea

Calibrarea MEB trebuie verificată cel puțin o dată pe săptămână (la modul ideal o dată pe zi) cu ajutorul unei grile de calibrare omologată. Valorile de calibrare trebuie comparate cu o normă omologată și, în cazul în care valoarea măsurată (MEB) se situează în afara plăjei de 2 % din valoarea omologată, calibrarea MEB trebuie ajustată și verificată din nou.

MEB trebuie să ofere cel puțin o rezoluție cu un diametru minim vizibil de 0,2  $\mu\text{m}$ , utilizând o matrice de prelevare reală și un grosisment de  $\times 2\,000$ .

## 1.5.3.3.2. Funcționarea

MEB trebuie utilizat la un grosisment de 10 000 <sup>(1)</sup> în condiții care oferă o bună rezoluție și o imagine acceptabilă la viteze de baleiaj reduse de, spre exemplu, 5 secunde per cadru. Deși cerințele de funcționare ale diferitelor MEB-uri pot fi diferite, este necesar ca, în general, pentru a obține cea mai bună vizibilitate și rezoluție posibile cu materiale prezentând o masă atomică relativ scăzută, să se utilizeze tensiuni de accelerare între 5-10 keV cu o dimensiune redusă a spotului și o distanță mică de lucru. Având în vedere că se realizează o traversare liniară, este necesar să se utilizeze o înclinare de 0° pentru a reduce la minimum refocalizarea sau, dacă MEB-ul prezintă o fază eucentrică, trebuie să se utilizeze distanța de lucru eucentrică. Un grosisment inferior poate fi utilizat dacă materialul nu conține fibre mici și dacă diametrele fibrelor sunt mari ( $> 5\ \mu\text{m}$ ).

1.5.3.4. *Dimensionare*

## 1.5.3.4.1. Examinare la un grosisment redus pentru a analiza eșantionul

Inițial, eșantionul trebuie examinat la un grosisment redus pentru a identifica existența unei aglutinări de fibre mari și pentru a determina densitatea fibrei. În cazul formării unei aglutinări excesive, se recomandă pregătirea unui nou eșantion.

Pentru a garanta acuratețea datelor statistice, este necesar să se măsoare un număr minim de fibre. O densitate mare a fibrelor poate părea de dorit, deoarece examinarea câmpurilor goale necesită timp și nu aduce nicio contribuție în ceea ce privește analiza. Cu toate acestea, dacă filtrul este supraîncărcat, măsurarea tuturor fibrelor măsurabile devine dificilă și, având în vedere că fibrele mici pot fi ascunse de altele mai mari, ele sunt susceptibile de a nu fi observate.

<sup>(1)</sup> Pentru fibrele de 3  $\mu\text{m}$ , a se vedea nota precedentă.

▼ **M1**

O densitate superioară a fibrelor, de 150 de fibre per milimetru de traversare liniară, poate antrena o supraestimare a LWGMD. Pe de altă parte, concentrațiile reduse de fibre vor duce la creșterea timpului necesar efectuării analizei. Este adesea mai eficient din punctul de vedere al costurilor să se pregătească un eșantion cu o densitate a fibrei apropiată de valoarea optimă, decât să se insiste în ceea ce privește numărarea filtrelor cu concentrații reduse. Densitatea optimă de fibre trebuie să ofere o medie de aproximativ una sau două fibre numărabile per câmpuri vizuale la un grosiment de 5 000. Cu toate acestea, densitatea optimă va depinde de dimensiunea (diametrul) fibrelor, fiind așadar necesar ca operatorul să se bazeze pe experiența acumulată atunci când decide dacă densitatea fibrei este sau nu aproape de valoarea optimă.

#### 1.5.3.4.2. Ponderarea pe lungime a diametrelor fibrelor

Numai fibrele care ating (sau intersectează) o linie (infinit) subțire trasată pe ecranul MEB sunt numărate. Din acest motiv, trebuie să se traseze o linie orizontală (sau verticală) de-a lungul centrului ecranului.

De asemenea, este posibil să se fixeze un punct unic în centrul ecranului și să se procedeze la un baleiaj continuu într-o singură direcție de-a lungul filtrului. Diametrul fiecărei fibre, al cărei raport de aspect depășește 3:1 și care atinge sau intersectează acest punct, trebuie măsurat și înregistrat.

#### 1.5.3.4.3. Dimensionarea fibrei

Se recomandă măsurarea a minimum 300 de fibre. Fiecare fibră este măsurată o singură dată la punctul de intersectare cu linia sau punctul trasat pe imagine (sau în apropierea punctului de intersectare, dacă marginile fibrei sunt ascunse). Dacă este vorba de fibre care prezintă secțiuni transversale neuniforme, trebuie să se recurgă la o măsurătoare reprezentând diametrul mediu al fibrei. Trebuie să se acorde o atenție deosebită definirii marginii și măsurării distanței celei mai scurte dintre marginile fibrei. Dimensionarea se poate realiza on-line sau off-line, utilizându-se imagini sau fotografii stocate. Se recomandă utilizarea sistemelor semiautomate de măsurare a imaginii, care descarcă datele direct pe o foaie de calcul, deoarece acestea permit să se câștige timp, duc la eliminarea erorilor de transcriere și la automatizarea calculelor.

Extremitățile fibrelor lungi trebuie verificate la un grosiment redus, pentru a garanta că acestea nu revin în câmpul vizual în care se efectuează măsurătoarea și că sunt măsurate o singură dată.

## 2. DATE

### 2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

În general, diametrele fibrelor nu au o distribuție normală. Cu toate acestea, prin efectuarea unei transformări log, este posibilă obținerea unei distribuții apropiate de cea normală.

Calculați media aritmetică ( $\ln D$  mediu) și deviația standard ( $DS_{\ln D}$ ) a logaritmului în raport cu valorile de bază ( $\ln D$ ) ale diametrelor celor  $n$  fibre ( $D$ ).

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

**▼ M1**

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

Deviația standard se împarte la rădăcina pătrată a numărului de măsurători (n) pentru a obține eroarea standard ( $ES_{\ln D}$ ).

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

Scădeți de două ori eroarea standard din medie și calculați exponențiala acestei valori (media minus două erori standard) pentru a obține media geometrică minus două erori standard geometrice.

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

### 3. **RAPORTAREA**

#### RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

- Valoarea LWGMD-2ES.
- Toate deviațiile și, în special, cele care riscă să afecteze precizia sau acuratețea rezultatelor, precum și justificările pertinente.

### 4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

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.

**▼M4****A.23. COEFICIENT DE PARTIȚIE (1-OCTANOL/APĂ): METODA AGITĂRII LENTE****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 123 (2006) a OCDE. Valorile coeficientului de partiție 1-octanol/apă ( $P_{OW}$ ) până la  $\log P_{OW}$  de 8,2 au fost determinate cu precizie prin metoda agitării lente (1). Prin urmare, aceasta este o abordare experimentală adecvată pentru determinarea directă a  $P_{OW}$  al substanțelor puternic hidrofobe.
2. Alte metode pentru determinarea coeficientului de partiție 1-octanol/apă ( $P_{OW}$ ) sunt metoda „agitării flaconului” (2) și determinarea  $P_{OW}$  din comportamentul de retenție HPLC (cromatografie lichidă de înaltă performanță) cu fază inversată (3). Metoda „agitării flaconului” este predispusă la artefacte din cauza transferului micro-picăturilor de octanol în faza apoasă. Odată cu creșterea valorilor  $P_{OW}$ , prezența acestor picături în faza apoasă duce la o supraestimare crescândă a concentrației substanței testate în apă. Prin urmare, utilizarea sa este limitată la substanțe cu  $\log P_{OW} < 4$ . A doua metodă se bazează pe date solide privind valorile  $P_{OW}$  determinate direct, pentru calibrarea relației între comportamentul de retenție la HPLC (cromatografie lichidă de înaltă performanță) pentru calibrarea relației între comportamentul de retenție la HPLC și valorile măsurate ale  $P_{OW}$ . Un proiect de orientare OCDE a fost disponibil pentru determinarea coeficienților de partiție 1-octanol/apă ale substanțelor ionizabile (4), dar acesta nu mai trebuie să fie folosit.
3. Această metodă de testare a fost elaborată în Olanda. Precizia metodelor descrise aici a fost validată și optimizată într-un studiu de validare cu teste de comparare interlaboratoare la care au participat 15 laboratoare (5).

**CONSIDERAȚII INIȚIALE****Semnificație și utilizare**

4. Pentru substanțe organice inerte s-au identificat relații foarte semnificative între coeficienții de partiție 1 octanol/apă ( $P_{OW}$ ) și bioacumularea lor în pești. În plus, s-a demonstrat că  $P_{OW}$  este corelat cu toxicitatea pentru pești și cu absorbția substanțelor chimice în solide, cum sunt solurile și sedimentele. O privire de ansamblu extinsă a acestor relații a fost prezentată în referința bibliografică (6).
5. S-a stabilit o mare varietate de relații între coeficientul de partiție 1-octanol/apă și alte proprietăți ale substanței relevante pentru toxicologia și chimia mediului. În consecință, coeficientul de partiție 1-octanol/apă a devenit un parametru important în evaluarea riscului prezentat de substanțe chimice pentru mediu, precum și în estimarea evoluției substanțelor chimice în mediu.

**Domeniu de aplicare**

6. Experimentul cu agitare lentă este conceput pentru a reduce formarea micro-picăturilor din picăturile de 1-octanol în faza apoasă. În consecință, nu intervine supraestimarea concentrației în fază apoasă din cauza moleculelor de substanță testată asociate cu aceste picături. Prin urmare, metoda amestecării lente este adecvată în special pentru determinarea  $P_{OW}$  la substanțe cu valori ale  $\log P_{OW}$  cel puțin egale cu 5, pentru care metoda agitării flaconului (2) este predispusă să ducă la rezultate eronate.

▼ **M4****DEFINIȚIE ȘI UNITĂȚI**

7. Coeficientul de partiție a unei substanțe între apă și un solvent lipofil (1-octanol) caracterizează distribuția la echilibru a substanței chimice între cele două faze. Coeficientul de partiție între apă și 1-octanol ( $P_{OW}$ ) este definit ca raportul între concentrațiile la echilibru ale substanței testate în 1-octanol saturat cu apă ( $C_O$ ) și apă saturată cu 1-octanol ( $C_W$ ).

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

Ca raport de concentrații,  $P_{OW}$  este adimensional. Cel mai adesea este prezentat ca logaritm în baza 10 ( $\log P_{OW}$ ).  $P_{OW}$  este dependent de temperatură, iar datele consemnate trebuie să includă temperatura de măsurare.

**PRINCIPIUL METODEI**

8. Pentru a determina coeficientul de partiție, apa, 1-octanolul și substanța testată sunt echilibrate între ele la temperatură constantă. Apoi se determină concentrațiile substanței testate în cele două faze.
9. Dificultățile experimentale asociate cu formarea de micro-picături în cursul experimentului cu agitarea flaconului se pot reduce prin experimentul cu agitație lentă, propus aici. În experimentul cu agitare lentă, apa, 1-octanolul și substanța testată sunt echilibrate într-un reactor termostatat cu amestecare. Schimbul între faze este accelerat prin agitare. Agitarea introduce o turbulență limitată, care îmbunătățește schimbul între 1-octanol și apă fără să se formeze micropicături (1).

**APLICABILITATEA TESTULUI**

10. Deoarece prezența altor substanțe în afara substanței testate ar putea influența coeficientul de activitate al substanței testate, substanța trebuie să fie testată în stare pură. Se folosește sortul disponibil comercial cu cea mai mare puritate pentru experimentul privind partiția 1-octanol/apă.
11. Prezenta metodă se aplică la substanțe pure care nu disociază și nu se asociază și care nu prezintă o activitate de interfață semnificativă. Ea se poate aplica pentru a determina raportul de partiție 1-octanol/apă pentru asemenea substanțe și pentru amestecuri. Când metoda este folosită pentru amestecuri, rapoartele de partiție 1-octanol/apă determinate sunt condiționale și depind de compoziția chimică a amestecului testat și de compoziția electrolitului folosit ca fază apoasă. Cu condiția executării unor etape suplimentare, metoda este aplicabilă și la compuși care disociază sau se asociază (punctul 12).
12. Din cauza echilibrelor multiple în apă și 1-octanol implicate în partiția 1-octanol/apă a substanțelor care disociază, de exemplu acizi organici și fenoli, baze organice și substanțe organometalice, raportul de partiție 1-octanol/apă este o constantă condițională care depinde mult de compoziția electrolitului (7) (8). Prin urmare, pentru determinarea raportului de partiție 1-octanol/apă este necesar ca pH-ul și compoziția electrolitului să fie controlate în cadrul experimentului și raportate. La evaluarea acestor rapoarte de partiție trebuie să se aplice o apreciere pe bază de experiență. Folosind valoarea constantei (constantelor) de disociere, trebuie să se aleagă valori adecvate ale pH-ului, astfel încât să se determine un raport de partiție pentru fiecare stare de ionizare. La testarea compușilor organometalici se folosesc soluții tampon care nu formează complecși (8). Luând în considerare cunoștințele existente privind chimia soluțiilor apoase (constante de complexare, constante de disociere), condițiile experimentale trebuie să fie alese astfel încât să se poată estima speciația substanței testate în faza apoasă. Forța ionică trebuie să fie identică în toate experimentele, prin utilizarea unui electrolit de fond.

▼ **M4**

13. Dificultățile testării pot rezulta din efectuarea sa pentru substanțe cu solubilitate redusă în apă sau cu  $P_{OW}$  ridicat, deoarece concentrațiile în apă pot fi atât de reduse încât determinarea lor precisă este dificilă. Această metodă de testare prezintă recomandări pentru abordarea acestei probleme.

**INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ**

14. Reactivii chimici trebuie să fie de puritate analitică sau mai mare. Se recomandă utilizarea substanțelor de testare nemarcate, cu o compoziție cunoscută și, de preferință, cu o puritate minimă de 99 % sau a substanțelor de testare marcate radioactiv, cu compoziție și puritate radiochimică cunoscute. La indicatorii cu timpul de înjumătățire scurt trebuie să se aplice corecții de dezintegrare. În cazul substanțelor de testare marcate radioactiv, se folosește o metodă analitică specifică, pentru a asigura că radioactivitatea măsurată este legată direct de substanța testată.
15. O estimare a  $\log P_{OW}$  se poate obține cu ajutorul unui software disponibil în comerț pentru estimarea  $\log P_{OW}$  sau folosind raportul dintre solubilitățile în cei doi solvenți.
16. Înainte de efectuarea unui test cu agitare lentă pentru determinarea  $P_{OW}$ , trebuie să se cunoască următoarele informații privind substanța testată:

- (a) formula structurală;
- (b) metode analitice adecvate pentru determinarea concentrației substanței în apă și 1-octanol;
- (c) constanta (constantele) de disociere a(le) substanțelor ionizabile [Orientarea 112 a OCDE (9)];
- (d) solubilitatea în apă (10);
- (e) hidroliza abiotică (11);
- (f) biodegradabilitatea rapidă (12);
- (g) presiunea de vapori (13).

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură și echipament**

17. Este necesar echipament de laborator standard, care să cuprindă, în special, următoarele:
- agitatoare magnetice și baghete agitatoare acoperite cu teflon, pentru agitarea fazei apoase;
  - instrumente analitice, adecvate pentru determinarea concentrării substanței testate în apă, la concentrațiile anticipate;
  - vas de agitare cu robinet în partea inferioară. În funcție de estimarea  $\log P_{OW}$  și a limitei de detecție (LOD) a compusului testat, trebuie luată în considerare utilizarea unui vas de reacție cu aceeași geometrie, cu capacitate mai mare de un litru, astfel încât să se poată asigura un volum de apă suficient pentru extracția și analiza chimică. Astfel se vor obține concentrații mai mari în extrasul apos și, implicit, determinarea analitică va fi mai credibilă. În apendicele 1 se prezintă un tabel cu estimări ale volumului minim necesar, valoarea LOD a compusului, valoarea estimată  $\log P_{OW}$  și solubilitatea sa în apă. Tabelul se bazează pe relația între  $\log P_{OW}$  și raportul între solubilitățile în octanol și apă, așa cum se prezintă de către Pinsuwan *et al.* (14):

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

**▼ M4**

unde:

$$SR = S_{\text{oct}}/S_w \text{ (ca molaritate);}$$

și pe relația indicată de Lyman (15) pentru estimarea solubilității în apă. Solubilitățile în apă calculate cu ecuația din apendicele 1 trebuie considerate ca o primă estimare. Trebuie să se rețină faptul că utilizatorul este liber să estimeze solubilitatea în apă prin intermediul oricărei relații considerată ca reprezentând mai bine relația între caracterul hidrofob și solubilitate. Pentru compuși solizi, se recomandă, de exemplu, includerea punctului de topire în estimarea solubilității. În cazul în care se folosește o ecuație modificată, trebuie stabilit dacă mai este valabilă ecuația pentru calculul solubilității în octanol. În apendicele 2 se prezintă un desen schematic al unui vas de amestecare cu manta din sticlă cu volum de aproximativ 1 litru. Proporțiile vasului prezentat în apendicele 2 s-au dovedit favorabile și trebuie să fie menținute atunci când se utilizează un aparat de dimensiune diferită;

— este esențial un mijloc de menținere a temperaturii constante în timpul experimentului cu agitare lentă.

18. Vasele sunt confecționate dintr-un material inert, astfel încât adsorbția pe suprafețele vasului să fie neglijabilă.

#### **Pregătirea soluțiilor de testare**

19. Determinarea  $P_{OW}$  se face cu cel mai pur sortiment de 1-octanol disponibil în comerț (cel puțin + 99 %). Se recomandă purificarea 1-octanolului prin extracție cu acid, bază și apă și uscare ulterioară. În plus, se poate folosi distilarea pentru purificarea 1-octanolului. Pentru prepararea soluțiilor standard ale substanțelor testate se folosește 1-octanol purificat. Apa care se va folosi pentru determinarea  $P_{OW}$  este distilată în aparatură din sticlă sau sticlă de cuarț sau obținută dintr-un sistem de purificare sau se poate folosi apă de puritate HPLC. Este necesară filtrarea printr-un filtru de 0,22 μm pentru apa distilată și se includ probe-martor pentru a verifica dacă în extrasele concentrate nu există impurități care ar putea interfera cu substanța testată. În cazul în care se folosește un filtru din fibre de sticlă, el trebuie să fie curățat prin încălzire la 400 °C, timp de cel puțin trei ore.
20. Ambii solvenți sunt saturați reciproc înainte de experiment, prin echilibrarea lor într-un vas suficient de mare. Acest lucru se realizează prin agitarea lentă a sistemului bifazic timp de două zile.
21. Se alege o concentrație adecvată a substanței testate și se dizolvă în 1-octanol (saturat cu apă). Coeficientul de partiție 1-octanol/apă trebuie să fie determinat în soluții diluate în 1-octanol și apă. Prin urmare, concentrația substanței testate nu trebuie să depășească 70 % din solubilitatea sa, cu o concentrație maximă de 0,1 M în fiecare fază (1). Soluțiile în 1-octanol folosite pentru experiment trebuie să nu conțină particule solide în suspensie din substanța testată.
22. O cantitate adecvată de substanță testată se dizolvă în 1-octanol (saturat cu apă). În cazul în care valoarea estimată pentru  $\log P_{OW}$  este mai mare de 5, trebuie avut grijă ca soluțiile de 1-octanol folosite pentru experiment să nu conțină particule solide în suspensie din substanța testată. În acest scop, pentru substanțe cu o valoare estimată a  $\log P_{OW} > 5$  se aplică următoarea procedură:

— se dizolvă substanța testată în 1-octanol (saturat cu apă);



**▼ M4**

- se lasă soluția suficient timp pentru a permite sedimentarea particulelor solide în suspensie. În timpul perioadei de sedimentare, se monitorizează concentrația substanței testate;
- după ce concentrațiile măsurate în soluția 1-octanol au atins valori stabile, soluția stoc se diluează cu un volum adecvat de 1-octanol;
- se măsoară concentrația soluției stoc diluate. În cazul în care concentrația măsurată este în concordanță cu diluția, soluția stoc diluată se poate folosi în experimentul cu agitare lentă.

**Extracția și analiza probelor**

23. Pentru analiza substanței testate se folosește o metodă analitică validată. Investigatorii trebuie să prezinte dovezi că valorile concentrațiilor în 1-octanol saturat cu apă și în faza apoasă saturată cu 1-octanol în timpul experimentului sunt peste limita metodei de cuantificare a procedurilor analitice folosite. Recuperările analitice ale substanței testate din faza apoasă și faza de 1-octanol trebuie să fie stabilite înainte de experiment în acele cazuri pentru care sunt necesare metode de extracție. Semnalul analitic trebuie să fie corectat pentru probele-martor și trebuie să se evite antrenarea analitului de la o probă la alta.
24. Este probabil ca înainte de analiză să fie necesară extracția fazei apoase cu un solvent organic și preconcentrarea extrasului, din cauza concentrațiilor relativ scăzute de substanțe testate hidrofobe în faza apoasă. Din același motiv, este necesară reducerea concentrațiilor finale ale probelor-martor. În acest scop, trebuie să se folosească solvenți de mare puritate, preferabil solvenți pentru analiza reziduurilor. În plus, lucrul cu sticlărie curățată în prealabil cu atenție (de exemplu, prin spălare cu solvent sau încălzire la temperatură ridicată) poate contribui la evitarea contaminării încrucișate.
25. O valoare estimată a  $\log P_{OW}$  se poate obține cu ajutorul unui program de estimare sau prin apreciere pe bază de experiență. În cazul în care valoarea este mai mare de 6, trebuie să se monitorizeze cu atenție corecțiile pe bază de probe-martor și antrenarea analitului. În mod similar, dacă estimarea  $\log P_{OW}$  depășește valoarea 6, este obligatorie utilizarea unui standard surogat pentru corecția în funcție de recuperare, astfel încât să se poată atinge factori ridicați de preconcentrare. Pe piață sunt disponibile mai multe programe informatice pentru estimarea  $\log P_{OW}$ <sup>(1)</sup>, de exemplu Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) și ACD log P (19). Descrieri ale metodelor de estimare pot fi găsite în referințele bibliografice (20) (21) (22).
26. Limitele de cuantificare (LOQ) pentru determinarea substanței testate în 1-octanol și apă se stabilesc cu ajutorul unor metode acceptate. Ca regulă generală, limita de cuantificare a metodei se poate determina drept concentrația în apă sau 1-octanol care produce un raport de 10 între semnal și zgomot. Se alege o metodă adecvată de extracție și preconcentrare și trebuie să se specifice și recuperările analitice. Se alege un factor adecvat de preconcentrare, pentru a obține un semnal de dimensiunea necesară la determinarea analitică.

<sup>(1)</sup> Această informație este prezentată doar pentru beneficiul utilizărilor. Se pot folosi alte programe informatice dacă se poate demonstra că generează aceleași rezultate.

▼ **M4**

27. Pe baza parametrilor metodei analitice și a concentrațiilor anticipate, se determină o dimensiune aproximativă a probei, necesară pentru determinarea precisă a concentrației compusului. Trebuie să se evite utilizarea unor probe de apă care sunt prea mici pentru obținerea unui semnal analitic suficient. De asemenea, trebuie să se evite utilizarea unor probe de apă excesiv de mari, întrucât cantitatea de apă rămasă poate fi insuficientă pentru numărul minim de analize necesare ( $n = 5$ ). În apendicele 1, volumul minim al probei este indicat în funcție de volumul vasului, LOD a substanței testate și solubilitatea substanței testate.
28. Cuantificarea substanțelor testate are loc prin compararea cu curbele de calibrare a compusului respectiv. Concentrațiile din probele analizate trebuie să fie încadrate de concentrațiile standardelor.
29. Pentru substanțe testate cu o valoare estimată a  $\log P_{OW}$  peste 6, un surrogat standard trebuie să fie adăugat în proba de apă înainte de extracție, pentru a înregistra pierderile produse în timpul extracției și preconcentrării probelor de apă. Pentru corecția precisă în funcție de recuperare, surrogatele trebuie să aibă proprietăți foarte apropiate sau identice cu cele ale substanței testate. De preferință, se folosesc în acest scop analogi ai substanțelor de interes marcați cu izotopi (stabili), (de exemplu, izotopi cu atomii de hidrogen înlocuiți cu deuteriu sau marcați cu  $^{13}C$ ). În cazul în care nu este posibilă utilizarea de izotopi stabili, adică  $^{13}C$  sau  $^2H$ , trebuie să se demonstreze, pe baza unor date credibile din literatură, că proprietățile fizico-chimice ale surrogatului sunt foarte apropiate de cele ale substanței testate. În timpul extracției lichid-lichid a fazei apoase, se pot forma emulsii. Ele pot fi reduse prin adăugare de sare și lăsarea emulsiei să se separe peste noapte. Trebuie să se consemneze metodele folosite pentru extracție și preconcentrarea probelor.
30. Dacă este necesar, probele extrase din faza 1-octanol pot fi diluate cu un solvent adecvat înainte de analiză. În plus, se recomandă ca standardele surrogat pentru corecția în funcție de recuperare să fie utilizate pentru substanțe la care experimentele de recuperare au demonstrat un grad ridicat de variație în experimentele de recuperare (deviația standard relativă  $> 10\%$ ).
31. Trebuie să se consemneze detaliile metodei analitice. Acestea includ metoda de extracție, preconcentrare și factorii de diluție, parametrii instrumentelor, procedura de calibrare, domeniul de calibrare, recuperarea analitică a substanței testate din apă, adăugarea de standarde surrogat pentru corecția în funcție de recuperare, valorile probelor-martor, limitele de detecție și limitele de cuantificare.

**Desfășurarea testului***Rapoarte optime 1-octanol/apă*

32. La alegerea volumelor de apă și 1-octanol, se iau în considerare LOQ în 1-octanol și apă, factorii de preconcentrare aplicați probelor de apă, volumele prelevate în 1-octanol și apă și concentrațiile anticipate. Din motive experimentale, volumul de 1-octanol în sistemul cu agitare lentă se alege astfel încât stratul de 1-octanol să fie suficient de gros ( $> 0,5$  cm) pentru a permite prelevarea din faza de 1-octanol fără a-l perturba.
33. Rapoartele tipice între faze folosite pentru determinările compușilor cu  $\log P_{OW}$  de cel puțin 4,5 sunt 20 până la 50 ml de 1-octanol și 950 până la 980 ml apă într-un vas de un litru.

▼ **M4***Condițiile de testare*

34. În timpul testului, vasul de reacție este termostatat pentru a reduce variația temperaturii sub 1 °C. Testul se efectuează la 25 °C.
35. Sistemul experimental este protejat față de lumina zilei, fie prin efectuarea experimentului într-o cameră obscură, fie prin acoperirea vasului de reacție cu folie de aluminiu.
36. Experimentul se realizează într-un mediu fără praf (pe cât posibil).
37. Sistemul 1-octanol-apă este agitat până ce se atinge echilibrul. Într-un experiment pilot, perioada de echilibrare este evaluată prin efectuarea unui experiment cu agitare lentă și prelevarea periodică de apă și 1-octanol. Prelevările se fac la intervale de minimum cinci ore.
38. Fiecare determinare a  $P_{OW}$  trebuie să se facă pe baza a minimum trei experimente independente cu agitare lentă.

*Determinarea timpului de echilibrare*

39. Se presupune că echilibrul este atins atunci când o regresie a raportului de concentrație 1-octanol/apă în funcție de timp pe o perioadă de patru intervale de timp generează o pantă care nu este semnificativ diferită de zero la un nivel al  $p$  de 0,05. Timpul minim de echilibrare este de o zi, înainte de a putea începe prelevarea. Ca regulă generală, prelevarea substanțelor cu o valoare estimată a  $\log P_{OW}$  sub 5 poate avea loc în timpul celei de-a doua și celei de-a treia zile. Pentru compuși mai hidrofobi poate fi necesar să se prelungească echilibrarea. La un compus cu  $\log P_{OW}$  de 8,23 (deca-cloribifenil) au fost suficiente 144 de ore pentru echilibrare. Echilibrul este evaluat prin intermediul prelevării repetate dintr-un singur vas.

*Începerea experimentului*

40. La începerea experimentului, vasul de reacție se umple cu apă saturată în 1-octanol. Se asigură suficient timp pentru a atingerea temperaturii termostatate.
41. În vasul de reacție se adaugă cu atenție cantitatea dorită de substanță chimică testată (dizolvată în volumul necesar de 1-octanol saturat cu apă). Aceasta este o etapă crucială a experimentului, deoarece trebuie să se evite amestecarea turbulentă a celor două faze. În acest scop, faza 1-octanol se poate pipeta lent pe pereții vasului de reacție, aproape de suprafața apei. Astfel, ea se va scurge de-a lungul peretelui de sticlă, formând o peliculă deasupra fazei apoase. Se evită întotdeauna turnarea directă a 1-octanolului în flacon; nu trebuie să se permită căderea picăturilor de 1-octanol direct în apă.
42. După începerea agitării, viteza de agitare este crescută lent. În cazul în care motoarele de agitare nu se pot regla corespunzător, se ia în considerare utilizarea unui transformator. Viteza de agitare este reglată astfel încât la interfața între apă și 1-octanol să se creeze un vârtej cu adâncimea de 0,5 până la maximum 2,5 cm. Viteza de agitare trebuie să fie redusă dacă adâncimea vârtejului depășește 2,5 cm; în caz contrar, se pot forma micropicături din picăturile de 1-octanol în faza apoasă, conducând la o supraestimare a concentrației substanței testate în apă. Viteza maximă de agitare cu vârtej de 2,5 cm este recomandată pe baza rezultatelor din studiul de validare cu teste de comparare interlaboratoare (5). Acesta este un compromis între atingerea unei rate de echilibrare rapide și limitarea formării de micropicături de 1-octanol.

▼ **M4***Prelevarea și tratarea probelor*

43. Agitatorul trebuie să fie oprit înainte de prelevarea probelor și trebuie să se aștepte până ce mișcarea lichidelor a încetat. După încheierea prelevării, agitatorul se pornește din nou încet, așa cum se descrie mai sus, iar viteza de agitare este crescută treptat.
44. Faza apoasă este prelevată de la un robinet aflat în partea inferioară a vasului de reacție. Întotdeauna trebuie să se elimine volumul de apă stătută din robinete (aproximativ 5 ml la vasul prezentat în apendicele 2). Apa din robinete nu se agită, astfel încât nu este în echilibru cu volumul principal. Se notează volumul probelor de apă și se asigură că se ia în considerare cantitatea de substanță testată prezentă în apa eliminată, atunci când se stabilește un bilanț masic. Pierderile prin evaporare sunt minimizate lăsând apa să curgă lent în pâlnia de separare, astfel încât să nu se perturbe stratul de apă/1-octanol.
45. Probele de 1-octanol se obțin prin extragerea unei alicote mici (cca. 100  $\mu$ l) din stratul de 1-octanol cu o seringă de 100 microlitri fabricată exclusiv din sticlă și metal. Trebuie să se evite perturbarea interfeței. Se înregistrează volumul de lichid prelevat. Este suficientă o alicotă mică, deoarece proba de 1-octanol va fi diluată.
46. Trebuie să se evite etapele inutile de transfer al probelor. În acest scop, volumul probei se determină gravimetric. În cazul probelor de apă, acesta lucru se poate realiza prin colectarea probei de apă într-o pâlnie separatoare care conține deja volumul necesar de solvent.

**DATE ȘI RAPORT**

47. În conformitate cu această metodă de testare,  $P_{OW}$  este determinat prin efectuarea a trei experimente cu agitare lentă (trei unități experimentale) în cadrul cărora compusul cercetat este supus unor condiții identice. Regresia folosită pentru a demonstra atingerea echilibrului se bazează pe rezultatele a minim patru determinări ale  $C_O/C_W$  la intervale de timp consecutive. Acest lucru permite calcularea varianței ca măsură a incertitudinii valorii medii obținute din fiecare unitate experimentală.
48.  $P_{OW}$  poate fi caracterizat prin varianța datelor obținute din fiecare unitate experimentală. Această informație este folosită pentru a calcula  $P_{OW}$  ca medie ponderată a rezultatelor unităților experimentale individuale. Pentru aceasta, se folosește ca pondere inversul varianței rezultatelor unităților experimentale. Drept urmare, datele cu o variație mai mare (exprimată ca varianță) și, astfel, cu grad de încredere mai mic, au mai puțină influență asupra rezultatului față de datele cu varianță redusă.
49. În mod analog, se calculează deviația standard ponderată. Ea caracterizează repetabilitatea măsurătorii  $P_{OW}$ . O valoare redusă a deviației standard ponderate indică faptul că determinarea  $P_{OW}$  a avut o repetabilitate foarte mare în cadrul unui laborator. În continuare se prezintă interpretarea statistică oficială a datelor.

▼ **M4****Interpretarea rezultatelor***Demonstrarea atingerii echilibrului*

50. Logaritmul raportului între concentrația substanței testate în 1-octanol și apă [ $\log (C_o/C_w)$ ] este calculat pentru fiecare moment de prelevare a probelor. Atingerea echilibrului chimic este demonstrată prin reprezentarea grafică a acestui raport în funcție de timp. Un platou în acest grafic, care se bazează pe cel puțin patru momente consecutive, indică faptul că s-a atins echilibrul, iar compusul este dizolvat efectiv în 1-octanol. În caz contrar, trebuie să se continue testul până când patru momente succesive generează o pantă care nu este semnificativ diferită de 0 la un nivel p de 0,05, ceea ce indică faptul că  $\log C_o/C_w$  este independent de timp.

*Calcularea lui  $\log P_{OW}$* 

51. Valoarea lui  $\log P_{OW}$  pentru unitatea experimentală se calculează ca valoarea medie ponderată a  $\log C_o/C_w$  din porțiunea curbei  $\log C_o/C_w$  în funcție de timp pentru care s-a demonstrat echilibrul. Media ponderată se calculează prin ponderarea datelor cu inversul varianței, astfel încât influența datelor asupra rezultatului final este invers proporțională cu incertitudinea datelor.

*Valoarea medie a  $\log P_{OW}$* 

52. Valoarea medie a  $\log P_{OW}$  din diferite unități experimentale este calculată ca media rezultatelor unităților experimentale individuale ponderate cu varianțele respective.

Calculul se face astfel:

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

unde:

$\log P_{OW,i}$  = valoarea  $\log P_{OW}$  a unității individuale experimentale i;

$\log P_{OW,Av}$  = valoarea medie ponderată a determinărilor individuale ale  $\log P_{OW}$ ;

$w_i$  = ponderea statistică atribuită valorii  $\log P_{OW}$  a unității experimentale i;

Reciproca varianței  $\log P_{OW,i}$  se folosește ca  $w_i [w_i = \text{var} (\log P_{OW,i})^{-1}]$ .

53. Eroarea valorii medii a  $\log P_{OW}$  este estimată ca repetabilitatea  $\log C_o/C_w$  determinată în timpul fazei de echilibru în unitățile experimentale individuale. Ea este exprimată ca deviația standard ponderată a  $\log P_{OW,Av}$  ( $\sigma_{\log P_{OW,Av}}$ ) care, la rândul său, este o măsură a erorii asociate cu  $\log P_{OW,Av}$ . Deviația standard ponderată se poate calcula din varianța ponderată ( $\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$ ) astfel:

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

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0.5}$$

Simbolul n reprezintă numărul de unități experimentale.

**▼ M4****Raportul de testare**

54. Raportul de testare conține următoarele date:

*Substanța testată:*

- denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, structura chimică (indicându-se poziția marcării, atunci când se folosesc substanțe marcate radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea punctul 17);
- puritatea (impuritățile) substanței testate;
- puritatea de marcare pentru substanțele chimice marcate și activitatea molară (acolo unde este cazul);
- valoarea estimată preliminară a  $\log P_{ow}$ , precum și metoda folosită pentru determinarea sa.

*Condiții de testare:*

- datele la care au fost realizate studiile;
- temperatura în timpul experimentului;
- volumele de 1-octanol și apă la începutul testului;
- volumele probelor de 1-octanol și apă extrase;
- volumele de 1-octanol și apă rămase în vasele de reacție;
- descrierea vaselor de reacție și a condițiilor de agitare (geometria agitatorului și a vasului de reacție, înălțimea vârtejului în mm și, acolo unde este disponibilă, viteza de agitare) folosite;
- metodele analitice folosite pentru a determina substanța de testare și limita de cuantificare a metodei;
- intervalele de prelevare a probelor;
- pH-ul fazei apoase și substanțele tampon folosite când pH-ul este reglat pentru molecule ionizabile;
- numărul de duplicate.

*Rezultate:*

- repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;
- concentrațiile determinate ale substanței testate în 1-octanol și apă ca funcție de timp;
- verificarea bilanțului masic;
- temperatura și deviația standard sau domeniul de temperatură în timpul experimentului;
- regresia raportului de concentrație în timp;
- valoarea medie a  $\log P_{ow,Av}$  și eroarea sa standard;
- discutarea și interpretarea rezultatelor;

## ▼M4

- exemple de date primare din analize reprezentative (toate datele primare trebuie păstrate în conformitate cu standardele GLP), inclusiv recuperări ale surrogatelor și numărul de niveluri folosite în calibrare (împreună cu criteriile pentru coeficientul de corelație al curbei de calibrare) și rezultatele asigurării calității/controlului calității (QA/QC);
- în cazul în care este disponibil: raportul de validare a procedurii de testare (se va indica la referințele bibliografice).

## BIBLIOGRAFIE:

- (1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499-512.
- (2) Capitolul A.8 din prezenta anexă, „Coeficientul de partiție”.
- (3) Capitolul A.8 din prezenta anexă, „Coeficientul de partiție”.
- (4) OECD (2000), OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances, Paris.
- (5) Tolls J. (2002), Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000), Handbook of property estimation methods for chemicals, Lewis Publishers Boca Raton, F.L., USA.
- (7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993), *Environmental Organic Chemistry*, Wiley, New York, NY.
- (8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997), Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition, *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.
- (9) OECD (1981), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water, Paris.
- (10) Capitolul A.6 din prezenta anexă, „Solubilitatea în apă”.
- (11) Capitolul C.7 din prezenta anexă, „Degradarea – Degradarea abiotică: Hidroliza ca o funcție a pH-ului”.
- (12) Capitolul C.4 din prezenta anexă, părțile II-VII (metodele A-F) „Determinarea biodegradabilității «rapide»”.
- (13) Capitolul A.4 din prezenta anexă, „Presiunea de vapori”.
- (14) Pinsuwan S., Li A. and Yalkowsky S.H. (1995), Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.
- (15) Lyman W.J. (1990), Solubility in water. În: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, D.C., de la 2-1 la 2-52.
- (16) Leo A., Weininger D. (1989), *Medchem Software Manual*, Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- (17) Meylan W. (1993), SRC-LOGKOW for Windows, SRC, Syracuse, N.Y.
- (18) Compudrug L. (1992), ProLogP, Compudrug, Ltd, Budapest.
- (19) ACD. ACD logP, Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

**▼ M4**

- (20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds., *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- (21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
- (22) Jübermann O. (1958), Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.



▼ **M4***Apendicele 1*

**Foaie de calcul pentru calculul volumelor minime de apă necesare pentru detectarea substanțelor testate cu valori diferite ale log P<sub>ow</sub> în faza apoasă**

Ipoteze:

— volumul maxim al alicotelor individuale = 10 % din volumul total; 5 alicote = 50 % din volumul total;

— concentrația substanțelor testate =  $0,7 \times$  solubilitatea în fiecare fază. În cazul unor concentrații mai mici, sunt necesare volume mai mari;

— volumul folosit pentru determinarea LOD = 100 ml;

— log P<sub>ow</sub> în funcție de log S<sub>w</sub> și log P<sub>ow</sub> în funcție de SR (S<sub>oct</sub>/S<sub>w</sub>) sunt reprezentări rezonabile ale relațiilor pentru substanțele testate.

*Estimarea S<sub>w</sub>*

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

*Estimarea S<sub>oct</sub>*

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

▼ **M4**

| Masa totală a substanței testate (mg) | Masa <sub>oct</sub> /Masa <sub>apă</sub> | Masa <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mg) | Conc <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mg/l) | Masa <sub>oct</sub> (mg) | Conc <sub>oct</sub> (mg/l) |
|---------------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 319                                 | 526                                      | 2,5017                              | 2,6333                                | 1 317                    | 26 333                     |
| 1 686                                 | 1 664                                    | 1,0127                              | 1,0660                                | 1 685                    | 33 709                     |
| 2 158                                 | 5 263                                    | 0,4099                              | 0,4315                                | 2 157                    | 43 149                     |
| 2 762                                 | 16 644                                   | 0,1659                              | 0,1747                                | 2 762                    | 55 230                     |
| 3 535                                 | 52 632                                   | 0,0672                              | 0,0707                                | 3 535                    | 70 691                     |
| 4 524                                 | 1664 36                                  | 0,0272                              | 0,0286                                | 4 524                    | 90 480                     |
| 5 790                                 | 5263 16                                  | 0,0110                              | 0,0116                                | 5 790                    | 115 807                    |
| 7 411                                 | 1 664 357                                | 0,0045                              | 0,0047                                | 7 411                    | 148 223                    |
| 9 486                                 | 5 263 158                                | 0,0018                              | 0,0019                                | 9 486                    | 189 713                    |

*Calculul volumelor***Volum minim necesar pentru faza H<sub>2</sub>O la fiecare concentrație LOD**

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

*Legendă pentru calcule*

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 1 litru;

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 2 litri.

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 5 litri.

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 10 litri.

Depășește 10 % chiar și din vasul de echilibrare de 10 litri.

▼ **M4****Prezentare a volumelor necesare, ca funcție de solubilitate în apă și Log P<sub>ow</sub>**Volum minim necesar pentru faza H<sub>2</sub>O la fiecare concentrație LOD (ml)

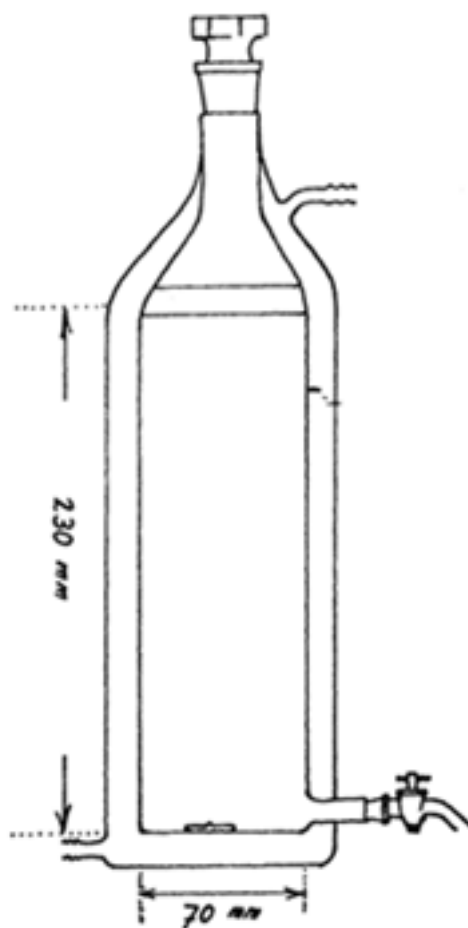
| log P <sub>ow</sub> | S <sub>w</sub> (mg/l) | LOD (micrograme/l)→ | 0,001 | 0,01   | 0,10     | 1,00      | 10         |
|---------------------|-----------------------|---------------------|-------|--------|----------|-----------|------------|
| 4                   | 10                    |                     | 0,01  | 0,12   | 1,19     | 11,90     | 118,99     |
|                     | 5                     |                     | 0,02  | 0,24   | 2,38     | 23,80     | 237,97     |
|                     | 3                     |                     | 0,04  | 0,40   | 3,97     | 39,66     | 396,62     |
| 4,5                 | 1                     |                     | 0,12  | 1,19   | 11,90    | 118,99    | 1 189,86   |
|                     | 5                     |                     | 0,02  | 0,20   | 2,03     | 20,34     | 203,37     |
|                     | 2                     |                     | 0,05  | 0,51   | 5,08     | 50,84     | 508,42     |
| 5                   | 1                     |                     | 0,10  | 1,02   | 10,17    | 101,68    | 1 016,83   |
|                     | 0,5                   |                     | 0,20  | 2,03   | 20,34    | 203,37    | 2 033,67   |
|                     | 0,375                 |                     | 0,23  | 2,32   | 23,18    | 231,75    | 2 317,53   |
| 5,5                 | 0,5                   |                     | 0,17  | 1,74   | 17,38    | 173,80    | 1 738,02   |
|                     | 0,2                   |                     | 0,43  | 4,35   | 43,45    | 434,51    | 4 345,05   |
|                     | 0,4                   |                     | 0,19  | 1,86   | 18,57    | 185,68    | 1 856,79   |
| 6                   | 0,2                   |                     | 0,37  | 3,71   | 37,14    | 371,36    | 3 713,59   |
|                     | 0,1                   |                     | 0,74  | 7,43   | 74,27    | 742,72    | 7 427,17   |
|                     | 0,05                  |                     | 1,49  | 14,85  | 148,54   | 1 485,43  | 14 854,35  |
| 6,5                 | 0,1                   |                     | 0,63  | 6,35   | 63,48    | 634,80    | 6 347,95   |
|                     | 0,05                  |                     | 1,27  | 12,70  | 126,96   | 1 269,59  | 12 695,91  |
|                     | 0,025                 |                     | 2,54  | 25,39  | 253,92   | 2 539,18  | 25 391,82  |
| 7                   | 0,0125                |                     | 5,08  | 50,78  | 507,84   | 5 078,36  | 50 783,64  |
|                     | 0,025                 |                     | 2,17  | 21,70  | 217,02   | 2 170,25  | 21 702,46  |
|                     | 0,0125                |                     | 4,34  | 43,40  | 434,05   | 4 340,49  | 43 404,93  |
| 7,5                 | 0,006                 |                     | 9,04  | 90,43  | 904,27   | 9 042,69  | 90 426,93  |
|                     | 0,003                 |                     | 18,09 | 180,85 | 1 808,54 | 18 085,39 | 180 853,86 |
|                     | 0,0015                |                     | 23,19 | 231,87 | 2 318,66 | 23 186,55 | 231 865,51 |
| 8                   | 0,001                 |                     | 46,37 | 463,73 | 4 637,31 | 46 373,10 | 463 731,03 |
|                     | 0,0005                |                     | 79,27 | 792,71 | 7 927,09 | 79 270,93 | 792 709,32 |

▼ **M4**

| log P <sub>ow</sub>             | S <sub>w</sub> (mg/l) | LOD (micrograme/l)→ | 0,001  | 0,01     | 0,10      | 1,00       | 10           |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|--------|----------|-----------|------------|--------------|
|                                 | 0,00025               |                     | 158,54 | 1 585,42 | 15 854,19 | 158 541,86 | 1 585 418,63 |
| 8                               | 0,001                 |                     | 33,88  | 338,77   | 3 387,68  | 33 876,77  | 338 767,72   |
|                                 | 0,0005                |                     | 67,75  | 677,54   | 6 775,35  | 67 753,54  | 677 535,44   |
|                                 | 0,00025               |                     | 135,51 | 1 355,07 | 13 550,71 | 135 507,09 | 1 355 070,89 |
|                                 | 0,000125              |                     | 271,01 | 2 710,14 | 27 101,42 | 271 014,18 | 2 710 141,77 |
| Volum folosit pentru<br>LOD (l) |                       | 0,1                 |        |          |           |            |              |

## Apendicele 2

**Exemplu de vas de testare cu manta din sticlă pentru  
experimentul cu agitare lentă, pentru determinarea P<sub>ow</sub>**



▼ **M6****A.24. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE (N-OCTANOL/APĂ),  
METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ  
PERFORMANȚĂ (HPLC)****INTRODUCERE**

Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 117 (2004).

1. Coeficientul de partiție (P) se definește ca raportul dintre concentrațiile de echilibru ale unei substanțe dizolvate într-un sistem bifazic constând din doi solvenți aproape nemiscibili. În cazul n-octanol și apă,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{apă}}$$

coeficientul de partiție fiind raportul dintre două concentrații, el este adimensional și de regulă este exprimat ca logaritm în baza 10.

2.  $P_{ow}$  reprezintă un parametru-cheie în studiile privind evoluția în mediu a substanțelor chimice. S-a dovedit existența unei relații foarte importante între  $P_{ow}$  al formei neionizate a substanțelor și bioacumularea lor în pești. S-a dovedit, de asemenea, că  $P_{ow}$  reprezintă un parametru util pentru estimarea adsorbției pe sol și sedimente și pentru stabilirea relațiilor structură-activitate cantitative pentru o gamă largă de efecte biologice.
3. Propunerea inițială privind această metodă de testare a avut la bază un articol scris de C.V. Eadsforth și P. Moser (1). Umweltbundesamt din Republica Federală Germania a coordonat în 1986 (2) dezvoltarea metodei de testare și o comparație interlaboratoare realizată de OCDE.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

4. Valorile  $\log P_{ow}$  cuprinse între - 2 și 4 (ocazional până la 5 sau mai mult) <sup>(1)</sup> pot fi determinate în mod experimental prin metoda agitării flaconului (capitolul A.8 din prezenta anexă, Orientarea OCDE privind testarea nr. 107). Metoda HPLC acoperă  $\log P_{ow}$  de la 0 până la 6 (1)(2)(3)(4)(5). Această metodă ar putea necesita o estimare a  $P_{ow}$  pentru a stabili substanțe de referință adecvate și pentru a susține concluziile trase din datele generate de test. Metodele de calcul sunt discutate succint în apendicele la această metodă de testare. Modul de operare HPLC este izocratic.
5. Valorile  $P_{ow}$  depind de condiții de mediu precum temperatura, pH-ul, tăria ionică etc., iar acestea trebuie definite în experiment în vederea interpretării corecte a datelor  $P_{ow}$ . Pentru substanțele ionizabile, ar putea deveni disponibilă și ar putea fi utilizată ca metodă alternativă o altă metodă [de exemplu proiectul de orientare OCDE privind metoda pH-metrică pentru substanțele ionizate (6)]. Deși acest proiect de orientare OCDE ar putea fi potrivit pentru determinarea  $P_{ow}$  pentru substanțele ionizabile, în anumite cazuri este mai adecvat să se utilizeze metoda HPLC la un nivel al pH-ului relevant din punctul de vedere al mediului (a se vedea punctul 9).

<sup>(1)</sup> Necesitatea de a realiza o fază de separație completă după ajustările echilibrului partiției și înainte de extragerea eșantioanelor pentru determinările analitice impune o limită superioară. Dacă se acordă atenția necesară, limita superioară poate fi extinsă la valori mai ridicate ale  $P_{ow}$ .

▼ **M6**

## PRINCIPIUL METODEI

6. HPLC cu fază inversă se efectuează în coloane analitice umplute cu o fază solidă disponibilă în comerț care conține lanțuri lungi de hidrocarburi (de exemplu C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) legate chimic pe silice.
7. O substanță chimică injectată într-o astfel de coloană separă faza mobilă cu solvent și faza staționară cu hidrocarburi în timp ce este transportată de-a lungul coloanei de faza mobilă. Substanțele sunt reținute proporțional cu coeficientul lor de partiție hidrocarbură/apă, mai întâi fiind eluate substanțele hidrofile și apoi substanțele lipofile. Timpul de retenție este descris de factorul de capacitate  $k$  rezultat din expresia:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

în care  $t_R$  este timpul de retenție al substanței de testare și  $t_0$  este timpul mort, adică timpul mediu necesar unei molecule de solvent pentru a trece prin coloană. Nu sunt necesare metode analitice cantitative, ci doar determinarea timpilor de retenție.

8. Coeficientul de partiție octanol/apă al unei substanțe de testare poate fi calculat prin determinarea în mod experimental a factorului său de capacitate  $k$  și apoi introducerea  $k$  în următoarea ecuație:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

unde:

$a$ ,  $b$  = coeficienți de regresie liniară.

Ecuația de mai sus poate fi obținută prin regresia liniară a logaritmului coeficienților de partiție octanol/apă ai substanțelor de referință față de logaritmul factorilor de capacitate ai substanțelor de referință.

9. Metoda HPLC cu fază inversă permite estimarea coeficienților de partiție în intervalul  $\log P_{ow}$  cuprins între 0 și 6, dar poate fi extinsă pentru a acoperi intervalul  $\log P_{ow}$  cuprins între 6 și 10 în cazuri excepționale. Aceasta ar putea necesita modificarea fazei mobile (3). Metoda nu este aplicabilă acizilor și bazelor puternice, complexilor metalici, substanțelor care reacționează cu eluentul sau agenților tensioactivi. Măsurătorile pot fi efectuate asupra substanțelor ionizabile în forma lor neionizată (acid liber sau bază liberă) numai utilizând o soluție tampon adecvată având un pH mai mic decât  $pK_a$  pentru un acid liber și mai mare decât  $pK_a$  pentru o bază liberă. În mod alternativ, metoda pH-metrică pentru testarea substanțelor ionizabile (6) ar putea deveni disponibilă și ar putea fi utilizată ca metodă alternativă (6). Dacă valoarea  $P_{ow}$  este determinată pentru a fi utilizată în clasificarea pericolelor pentru mediu sau în evaluarea riscurilor asupra mediului, testul ar trebui efectuat în intervalul de pH relevant pentru mediul natural, adică în intervalul de pH 5,0-9.
10. În unele cazuri, impuritățile pot face dificilă interpretarea rezultatelor din cauza incertitudinii atribuirii picurilor. Pentru amestecurile care au ca rezultat o bandă imprecisă, trebuie raportate limitele superioară și inferioară ale  $\log P_{ow}$  și % de arie al fiecărui pic al  $\log P_{ow}$ . Pentru amestecurile care prezintă un grup de omologi, trebuie precizată și media ponderată a  $\log P_{ow}$  (7), calculată pe baza valorilor  $P_{ow}$  unice și a valorilor % de arie corespunzătoare (8). Toate picurile care contribuie cu o arie de cel puțin 5 % la aria totală a picului trebuie luate în considerare pentru calcul (9):

▼ **M6**

$$\text{media ponderată log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\% \text{ de arie})}{\% \text{ din aria totală a picului}} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\% \text{ de arie}_i)}{\sum_i \% \text{ de arie}}$$

Media ponderată a log  $P_{ow}$  este valabilă numai pentru substanțele sau amestecurile (de exemplu uleiurile de tal) constând în omologi (de exemplu serii de alcani). Se pot obține rezultate relevante din măsurarea amestecurilor, cu condiția ca detectorul analitic utilizat să aibă aceeași sensibilitate față de toate substanțele din amestec și acestea să se poată dizolva în mod adecvat.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA DE TESTARE

11. Înainte de utilizarea metodei, trebuie să se cunoască constanta de disociere, formula structurală și solubilitatea în faza mobilă. În plus, ar fi utile informații despre hidroliză.

## CRITERII DE CALITATE

12. Pentru a crește coeficientul de încredere al măsurătorilor, trebuie să fie făcute determinări duble.

— Repetabilitatea: valoarea log  $P_{ow}$  derivată din măsurătorile repetate efectuate în condiții identice și utilizând același set de substanțe de referință trebuie să fie în intervalul  $\pm 0,1$  unități logaritmice.

— Reproducibilitatea: Dacă măsurătorile se repetă cu un set diferit de substanțe de referință, rezultatele pot fi diferite. În mod tipic, coeficientul de corelație  $R$  pentru relația dintre log  $k$  și log  $P_{ow}$  pentru un set de substanțe de testare este în jur de 0,9, corespunzând unui coeficient de partiție octanol/apă de log  $P_{ow} \pm 0,5$  unități logaritmice.

13. Testul de comparație interlaboratoare a arătat că prin metoda HPLC valorile log  $P_{ow}$  pot fi obținute în intervalul de  $\pm 0,5$  unități față de valorile obținute prin metoda agitării flaconului (2). Alte comparații pot fi găsite în literatura de specialitate (4)(5)(10)(11)(12). Graficele de corelație bazate pe substanțe de referință înrudite structural oferă cele mai precise rezultate (13).

## SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

14. Pentru a corela factorul de capacitate  $k$  măsurat al unei substanțe cu  $P_{ow}$  al acesteia, trebuie creat un grafic de calibrare utilizând cel puțin 6 puncte (a se vedea punctul 24). Selectarea substanțelor de referință adecvate este la latitudinea utilizatorului. Substanțele de referință ar trebui să aibă în mod normal valori ale log  $P_{ow}$  care să cuprindă valoarea log  $P_{ow}$  a substanței de testare, adică cel puțin o substanță de referință ar trebui să aibă valoarea  $P_{ow}$  mai mare decât cea a substanței de testare, iar o altă substanță să aibă valoarea  $P_{ow}$  mai mică decât cea a substanței de testare. Extrapolarea ar trebui utilizată numai în cazuri excepționale. Este de preferat ca aceste substanțe de referință să fie înrudite structural cu substanța de testare. Valorile log  $P_{ow}$  ale substanțelor de referință utilizate pentru calibrare ar trebui să fie bazate pe date experimentale fiabile. Totuși, pentru substanțele cu log  $P_{ow}$  ridicat (în mod normal mai mare de 4), pot fi utilizate valorile calculate dacă nu sunt disponibile date experimentale fiabile. Dacă se utilizează valori extrapolate, ar trebui stabilită o valoare-limită.

15. Sunt disponibile liste lungi de valori log  $P_{ow}$  pentru multe grupe de substanțe chimice (14)(15). Dacă nu sunt disponibile date despre coeficienții de partiție ai substanțelor chimice înrudite structural, atunci poate fi folosită o calibrare mai generală, stabilită cu alte substanțe de referință. Substanțele de referință recomandate și valorile  $P_{ow}$  ale acestora sunt enumerate în tabelul 1. Pentru substanțele ionizabile, valorile date se aplică formei neionizate. Caracterul plauzibil și calitatea valorilor au fost verificate pe parcursul testului de comparație interlaboratoare.

## ▼ M6

Tabelul 1

## Substanțele de referință recomandate

|    | Numărul CAS         | Substanța de referință               | log P <sub>ow</sub> | pKa                              |
|----|---------------------|--------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 1  | 78-93-3             | 2-butanonă<br>(metiletilcetonă)      | 0,3                 |                                  |
| 2  | 1122-54-9           | 4-acetilpiridină                     | 0,5                 |                                  |
| 3  | 62-53-3             | anilină                              | 0,9                 |                                  |
| 4  | 103-84-4            | acetanilidă                          | 1,0                 |                                  |
| 5  | 100-51-6            | alcool benzilic                      | 1,1                 |                                  |
| 6  | 150-76-5            | 4-metoxifenol                        | 1,3                 | pKa = 10,26                      |
| 7  | 122-59-8            | acid fenoxiacetic                    | 1,4                 | pKa = 3,12                       |
| 8  | 108-95-2            | fenol                                | 1,5                 | pKa = 9,92                       |
| 9  | 51-28-5             | 2,4-dinitrofenol                     | 1,5                 | pKa = 3,96                       |
| 10 | 100-47-0            | benzonitril                          | 1,6                 |                                  |
| 11 | 140-29-4            | fenilacetnitril                      | 1,6                 |                                  |
| 12 | 589-18-4            | alcool 4-metilbenzilic               | 1,6                 |                                  |
| 13 | 98-86-2             | acetofenonă                          | 1,7                 |                                  |
| 14 | 88-75-5             | 2-nitrofenol                         | 1,8                 | pKa = 7,17                       |
| 15 | 121-92-6            | acid 3-nitrobenzoic                  | 1,8                 | pKa = 3,47                       |
| 16 | 106-47-8            | 4-cloranilină                        | 1,8                 | pKa = 4,15                       |
| 17 | 98-95-3             | nitrobenzen                          | 1,9                 |                                  |
| 18 | 104-54-1            | alcool cinamilic<br>(alcool cinamic) | 1,9                 |                                  |
| 19 | 65-85-0             | acid benzoic                         | 1,9                 | pKa = 4,19                       |
| 20 | 106-44-5            | p-crezol                             | 1,9                 | pKa = 10,17                      |
| 21 | 140-10-3<br>(trans) | acid cinamic                         | 2,1                 | pKa = 3,89 (cis)<br>4,44 (trans) |
| 22 | 100-66-3            | anizol                               | 2,1                 |                                  |
| 23 | 93-58-3             | benzoat de metil                     | 2,1                 |                                  |
| 24 | 71-43-2             | benzen                               | 2,1                 |                                  |
| 25 | 99-04-7             | acid 3-metilbenzoic                  | 2,4                 | pKa = 4,27                       |
| 26 | 106-48-9            | 4-clorfenol                          | 2,4                 | pKa = 9,1                        |
| 27 | 79-01-6             | tricloretilenă                       | 2,4                 |                                  |
| 28 | 1912-24-9           | atrazină                             | 2,6                 |                                  |
| 29 | 93-89-0             | benzoat de etil                      | 2,6                 |                                  |



▼ **M6**

|    | Numărul CAS | Substanța de referință                | log P <sub>ow</sub> | pKa        |
|----|-------------|---------------------------------------|---------------------|------------|
| 30 | 1194-65-6   | 2,6-diclorbenzonitril                 | 2,6                 |            |
| 31 | 535-80-8    | acid 3-clorobenzoic                   | 2,7                 | pKa = 3,82 |
| 32 | 108-88-3    | toluen                                | 2,7                 |            |
| 33 | 90-15-3     | 1-naftol                              | 2,7                 | pKa = 9,34 |
| 34 | 608-27-5    | 2,3-dicloranilină                     | 2,8                 |            |
| 35 | 108-90-7    | clorbenzen                            | 2,8                 |            |
| 36 | 1746-13-0   | alil-fenileter                        | 2,9                 |            |
| 37 | 108-86-1    | brombenzen                            | 3,0                 |            |
| 38 | 100-41-4    | etilbenzen                            | 3,2                 |            |
| 39 | 119-61-9    | benzofenonă                           | 3,2                 |            |
| 40 | 92-69-3     | 4-fenilfenol                          | 3,2                 | pKa = 9,54 |
| 41 | 89-83-8     | timol                                 | 3,3                 |            |
| 42 | 106-46-7    | 1,4-diclorbenzen                      | 3,4                 |            |
| 43 | 122-39-4    | difenilamină                          | 3,4                 | pKa = 0,79 |
| 44 | 91-20-3     | naftalină                             | 3,6                 |            |
| 45 | 93-99-2     | benzoat de fenil                      | 3,6                 |            |
| 46 | 98-82-8     | izopropilbenzen                       | 3,7                 |            |
| 47 | 88-06-2     | 2,4,6-triclorfenol                    | 3,7                 | pKa = 6    |
| 48 | 92-52-4     | bifenil                               | 4,0                 |            |
| 49 | 120-51-4    | benzoat de benzil                     | 4,0                 |            |
| 50 | 88-85-7     | 2,4-dinitro-6- <i>sec</i> -butilfenol | 4,1                 |            |
| 51 | 120-82-1    | 1,2,4-triclorbenzen                   | 4,2                 |            |
| 52 | 143-07-7    | acid dodecanoic                       | 4,2                 | pKa = 5,3  |
| 53 | 101-84-8    | difenil eter                          | 4,2                 |            |
| 54 | 85-01-8     | fenantren                             | 4,5                 |            |
| 55 | 104-51-8    | n-butilbenzen                         | 4,6                 |            |
| 56 | 103-29-7    | dibenzil                              | 4,8                 |            |
| 57 | 3558-69-8   | 2,6-difenil-piridină                  | 4,9                 |            |
| 58 | 206-44-0    | fluoranten                            | 5,1                 |            |
| 59 | 603-34-9    | trifenilamină                         | 5,7                 |            |
| 60 | 50-29-3     | DDT                                   | 6,5                 |            |

**▼ M6****DESCRIEREA METODEI****Estimarea preliminară a coeficientului de partiție**

16. Dacă este necesar, coeficientul de partiție al substanței de testare poate fi estimat, de preferat, utilizând o metodă de calcul (a se vedea apendicele) sau, dacă este cazul, utilizând raportul de solubilitate al substanței de testare în solvenții puri.

*Aparatură*

17. Este necesar un cromatograf în fază lichidă prevăzut cu o pompă cu impulsuri slabe și cu un sistem de detecție potrivit. Pentru marea majoritate a grupelor de substanțe chimice se aplică un detector UV, utilizând o lungime de undă de 210 nm sau un detector RI. Prezența grupelor polare în faza staționară poate afecta serios performanțele coloanei HPLC. Prin urmare, fazele staționare ar trebui să aibă un procentaj minim de grupe polare (16). Pot fi folosite umpluturi de microparticule pentru inversarea fazelor din comerț sau coloane gata umplute. Între sistemul de injecție și coloana analitică poate fi poziționată o coloană de protecție.

*Faza mobilă*

18. Pentru a prepara solventul de eluție se folosește metanol de calitate HPLC și apă distilată sau deionizată, iar solventul este degazat înainte de folosire. Ar trebui utilizată eluție izocratică. Ar trebui utilizate rapoarte metanol/apă cu un conținut minim de apă de 25 %. În general, un amestec metanol-apă 3:1 (v/v) este satisfăcător pentru eluția substanțelor cu log P de 6 într-o oră, la un debit de 1 ml/min. Pentru substanțele cu log P mai mare de 6 poate fi necesar să se scurteze timpul de eluție (și cel al substanțelor de referință) prin reducerea polarității fazei mobile sau a lungimii coloanei.
19. Substanța de testare și substanțele de referință trebuie să fie solubile în faza mobilă într-o concentrație suficientă pentru a permite detectarea lor. Numai în cazuri excepționale pot fi folosiți aditivi împreună cu amestecul metanol-apă, deoarece aditivii vor schimba proprietățile coloanei. În aceste cazuri trebuie să se confirme că timpul de retenție al substanței de testare și al substanțelor de referință nu este influențat. Dacă amestecul metanol-apă nu este corespunzător, pot fi folosite alte amestecuri solvent organic-apă, de exemplu etanol-apă, acetonitril-apă sau alcool izopropilic (2-propanol)-apă.
20. PH-ul eluentului este un factor critic pentru substanțele ionizabile. Ar trebui să se încadreze în intervalul de pH operațional al coloanei, care este de obicei cuprins între 2 și 8. Se recomandă utilizarea unei soluții tampon. Trebuie să se acorde o atenție deosebită evitării precipitării sărurilor și deteriorării coloanei care au loc în cazul unor amestecuri fază organică/soluție tampon. Măsurătorile HPLC cu faze staționare pe bază de silice cu un pH mai mare de 8 nu sunt în mod normal recomandabile deoarece folosirea unei faze mobile alcaline poate cauza scăderea rapidă a performanțelor coloanei.

*Soluții*

21. Substanțele de testare și substanțele de referință trebuie să fie suficient de pure pentru a atribui picurile din cromatograme substanțelor corespunzătoare. Dacă este posibil, substanțele care sunt folosite în scopuri de testare sau calibrare se dizolvă în faza mobilă. Dacă se utilizează un alt solvent decât faza mobilă pentru a dizolva substanțele de testare și substanțele de referință, faza mobilă ar trebui utilizată pentru diluarea finală anterioară injecției.

*Condițiile de testare*

22. În timpul măsurătorilor, temperatura nu ar trebui să varieze cu mai mult de  $\pm 1$  °C.

**▼ M6****Determinarea timpului mort  $t_0$** 

23. Timpul mort  $t_0$  poate fi măsurat prin folosirea unor substanțe organice nereținute (de exemplu tiourea sau formamida). Un timp mort mai precis poate fi extras din timpii de retenție mășurați sau dintr-un set de aproximativ șapte membri ai unei serii omoloage (de exemplu n-alchil metil cetone) (17). Timpii de retenție  $t_R (n_C + 1)$  sunt reprezentați față de  $t_R (n_C)$ , unde  $n_C$  este numărul de atomi de carbon. Se obține o linie dreaptă,  $t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 - A)t_0$ , unde A, care reprezintă  $k(n_C + 1)/k(n_C)$ , este constant. Timpul mort  $t_0$  se obține din intersecția dintre  $(1 - A)t_0$  și panta A.

**Ecuația de regresie**

24. Următorul pas este reprezentarea grafică a unei corelații între  $\log k$  și  $\log P$  pentru substanțele de referință adecvate cu valori  $\log P$  apropiate de valoarea așteptată pentru substanța de testare. În practică, se injectează simultan între 6 și 10 substanțe de referință. Timpii de retenție se determină, de preferat, cu un înregistrator conectat la sistemul de detecție. Logaritmi corespunzători ai factorilor de capacitate,  $\log k$ , se reprezintă grafic ca funcție de  $\log P$ . Ecuația de regresie se execută la intervale regulate, cel puțin o dată pe zi, astfel încât să se poată ține seama de posibilele schimbări ale performanțelor coloanei.

**DETERMINAREA  $P_{ow}$  AL SUBSTANȚEI DE TESTARE**

25. Substanța de testare se injectează în cele mai mici cantități detectabile. Timpul de retenție se determină în duplicat. Coeficientul de partiție al substanței de testare se obține prin interpolarea factorului de capacitate calculat pe graficul de calibrare. Pentru coeficienții de partiție foarte mici și pentru cei foarte mari este necesară extrapolarea. În special în aceste cazuri trebuie să se acorde atenție limitelor de încredere ale liniei de regresie. Dacă timpul de retenție al eșantionului este în afara intervalului de timpi de retenție obținut pentru etaloane, ar trebui stabilită o valoare-limită.

**DATE ȘI RAPORT****Raportul de testare**

26. În raport trebuie incluse următoarele informații:
- dacă s-a efectuat o estimare preliminară a coeficientului de partiție, valorile estimate și metoda utilizată; și dacă s-a utilizat o metodă de calcul, descrierea sa completă, inclusiv identificarea bazei de date și informații detaliate privind alegerea fragmentelor;
  - substanțele de testare și substanțele de referință: puritatea, formula structurală și numărul CAS;
  - descrierea echipamentelor și a condițiilor de operare: coloană analitică, coloană de protecție;
  - faza mobilă, modalitatea de detectare, intervalul de temperatură, pH-ul;
  - profilurile de eluție (cromatograme);
  - timpul mort și modul în care a fost măsurat;
  - datele privind retenția și valorile  $\log P_{ow}$  din literatura de specialitate pentru substanțele de referință folosite în calibrare;
  - detalii privind linia de regresie adaptată ( $\log k$  în funcție de  $\log P_{ow}$ ) și coeficientul de corelație al liniei, inclusiv intervalele de încredere;

▼ **M6**

- datele de retenție medii și valoarea interpolată  $\log P_{ow}$  pentru substanța de testare;
- în cazul unui amestec: cromatograma profilului de eluție cu valorile-limită indicate;
- valorile  $\log P_{ow}$  în raport cu % de arie al picului  $\log P_{ow}$ ;
- calculul utilizând o linie de regresie;
- media ponderată a valorilor  $\log P_{ow}$  calculate, dacă este cazul.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) C.V. Eadsforth și P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss și H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science*. 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt și R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science*. 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73.
- (6) OCDE (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez și C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke și K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, pp. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem și K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683.
- (11) W.E. Hammers, G.J.Meurs și C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky și A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography*. 7, 675.
- (13) S. Fujisawa și E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15, 787.

**▼M6**

- (14) C. Hansch și A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.
- (15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.
- (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony și J. Inczedy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼ **M6***Apendice***Metode de calcul al  $P_{ow}$** **INTRODUCERE**

1. Prezentul apendice reprezintă o scurtă introducere privind calcularea  $P_{ow}$ . Pentru mai multe informații, cititorul trebuie să consulte manualele (1)(2).
2. Valorile calculate ale  $P_{ow}$  se utilizează pentru:
  - a decide care metodă experimentală va fi utilizată: metoda agitării flaconului pentru  $\log P_{ow}$  cuprins între - 2 și 4 și metoda HPLC pentru  $\log P_{ow}$  cuprins între 0 și 6;
  - a selecta condițiile care trebuie utilizate în HPLC (substanțe de referință, raportul metanol/apă);
  - a verifica plauzibilitatea valorilor obținute prin intermediul metodelor experimentale;
  - a obține o estimare atunci când metodele experimentale nu pot fi aplicate.

**Principiul metodelor de calcul**

3. Metodele de calcul sugerate aici se bazează pe fragmentarea teoretică a moleculei în substructuri adecvate pentru care se cunosc creșteri fiabile ale valorilor  $\log P_{ow}$ .  $\log P_{ow}$  se obține prin însumarea valorilor corespunzătoare fragmentelor și a coeficienților de corecție pentru interacțiunile intramoleculare. Sunt disponibile liste ale constantelor fragmentelor moleculare și ale coeficienților de corecție (1)(2)(3)(4)(5)(6). Unele sunt actualizate cu regularitate (3).

**Fiabilitatea valorilor calculate**

4. În general, fiabilitatea metodelor de calcul scade cu cât complexitatea substanței studiate crește. În cazul moleculelor simple cu masă moleculară scăzută și una sau două grupe funcționale se pot aștepta abateri de la 0,1 până la 0,3 unități  $\log P_{ow}$  între rezultatele diferitelor metode de fragmentare și valorile măsurate. Marja de eroare va depinde de fiabilitatea constantelor fragmentelor moleculare utilizate, de capacitatea de recunoaștere a interacțiunilor intramoleculare (de exemplu legături de hidrogen) și de utilizarea corectă a coeficienților de corecție. În cazul substanțelor ionizante trebuie luate în considerare sarcina și gradul de ionizare (10).

**Metoda  $\pi$  Fujita-Hansch**

5. Constanta substituentului hidrofob,  $\pi$ , introdusă inițial de Fujita et al. (7) se definește ca:

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

unde PhX este un derivat aromatic iar PhH este substanța inițială.

$$\begin{aligned} \text{de exemplu } \pi_{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &= 0,71 \end{aligned}$$

Metoda  $\pi$  este de interes în principal pentru substanțele aromatice. Sunt disponibile valori  $\pi$  pentru un număr mare de substituenți (4)(5).

**Metoda Rekker**

6. Utilizând metoda Rekker (8), valoarea  $\log P_{ow}$  se calculează astfel:

$$\log P_{ow} = \sum_i a f_i + \sum_j (\text{termeni de interacțiune})$$

▼ **M6**

unde  $a_i$  reprezintă frecvența apariției unui anumit fragment în moleculă iar  $f_i$  reprezintă creșterea valorii  $\log P_{ow}$  a fragmentului. Termenii de interacțiune pot fi exprimați ca multiplu întreg al unei singure constante  $C_m$  (așa numita „constantă magică”). Constantele fragmentelor  $f_i$  și  $C_m$  au fost determinate dintr-o listă de 1 054 de valori  $P_{ow}$  experimentale pentru 825 de substanțe utilizând analiza regresivă multiplă (6)(8). Determinarea termenilor de interacțiune se realizează conform normelor stabilite (6)(8)(9).

**Metoda Hansch-Leo**

7. Utilizând metoda Hansch și Leo (4), valoarea  $\log P_{ow}$  se calculează astfel:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

unde  $f_i$  reprezintă o constantă de fragment molecular,  $F_j$  un coeficient (factor) de corecție,  $a_i$  și  $b_j$  frecvența corespunzătoare a apariției. Din valorile experimentale  $P_{ow}$  s-au extras, prin încercare și eroare, liste ale valorilor pentru fragmentele atomice și de grupă și ale coeficienților de corecție  $F_j$ . Coeficienții de corecție au fost împărțiți în mai multe clase distincte (1)(4). Pentru a ține cont de toate normele și coeficienții de corecție, s-au dezvoltat pachete software (3).

**METODA COMBINATĂ**

8. Calcularea  $\log P_{ow}$  al moleculelor complexe poate fi considerabil îmbunătățită, dacă molecula este împărțită în substructuri mai mari, pentru care există valori  $\log P_{ow}$  fiabile fie din tabele (3)(4), fie din măsurătorile existente. Astfel de fragmente (de exemplu heterocicurile, antrachinona, azobenzenul) pot fi apoi combinate cu valorile  $\pi$  Hansch sau cu constantele fragmentelor moleculare Rekker sau Leo.

*Observații*

- i) Metodele de calcul sunt aplicabile substanțelor ionizate parțial sau total numai atunci când se ține cont de factorii de corecție necesari.
- ii) Dacă se presupune că există legături de hidrogen intramoleculare, trebuie adăugați coeficienții de corecție corespunzători (aproximativ + 0,6 până la + 1,0 unități  $\log P_{ow}$ ) (1). Indicații privind prezența unor astfel de legături pot fi obținute din modelele stereochemice sau din datele spectroscopice.
- iii) Dacă sunt posibile mai multe forme tautomere, ar trebui folosită ca bază de calcul forma cea mai probabilă.
- iv) Revizuirile listelor de constante ale fragmentelor moleculare ar trebui urmate cu atenție.

**BIBLIOGRAFIE PRIVIND METODELE DE CALCUL**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

**▼ M6**

- (5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.
- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant,  $\pi$ , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).



**▼B****PARTEA B: METODE DE DETERMINARE A TOXICITĂȚII ȘI A ALTOR EFECTE ASUPRA SĂNĂTĂȚII****CUPRINS**

## INTRODUCERE GENERALĂ

- B.1 bis. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – PROCEDURA CU DOZĂ FIXĂ
- B.1 tris. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ
- B.2. TOXICITATEA ACUTĂ PRIN INHALARE
- B.3. TOXICITATEA ACUTĂ (ADMINISTRARE CUTANATĂ)
- B.4. TOXICITATE ACUTĂ: IRITAȚIE/COROZIUNE DERMICĂ
- B.5. TOXICITATE ACUTĂ: IRITAȚIE/COROZIUNE OCULARĂ
- B.6. SENSIBILIZARE CUTANATĂ
- B.7. STUDIU DE 28 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE
- B.8. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 28 DE ZILE
- B.9. TOXICITATE LA DOZĂ REPETATĂ (28 DE ZILE) (ADMINISTRARE CUTANATĂ)
- B.10. MUTAGENITATEA –TESTUL *IN VITRO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE CELULE DE MAMIFERE
- B.11. MUTAGENITATEA – TESTUL *IN VIVO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE MĂDUVĂ OȘOASĂ DE MAMIFERE
- B.12. MUTAGENITATEA – TESTUL *IN VIVO* DE MICRONUCLEU PE ERITROCITE DE MAMIFERE
- B.13/14. MUTAGENITATEA – TESTUL DE MUTAȚIE INVERSĂ PE BACTERII
- B.15. TESTE DE MUTAGENEZĂ ȘI DE DEPISTARE A CANCEROGENEZEI. MUTAȚIA GENICĂ – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.16. RECOMBINAREA MITOTICĂ – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.17. MUTAGENITATEA – TEST *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE
- B.18. ALTERAREA ȘI REPARAREA ADN-ului – SINTEZA NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS – *UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS*) – TEST *IN VITRO* PE CELULE DE MAMIFERE
- B.19. TEST *IN VITRO* DE SCHIMBARE A CROMATIDELOR SURORI (SCE)
- B.20. TEST DE LETALITATE RECESIVĂ ÎN RAPORT CU SEXUL LA *DROSOPHILA MELANOGASTER* (SLRL)

**▼B**

- B.21. TEST *IN VITRO* DE TRANSFORMARE A CELULELOR DE MAMIFERE
- B.22. TESTUL DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE
- B.23. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE
- B.24. TESTUL PETEI (*SPOT TEST*) LA ȘOARECI
- B.25. TRANSLOCAȚII EREDITARE LA ȘOARECI
- B.26. TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ. STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE
- B.27. TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ. STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA NEROZĂTOARE
- B. 28. STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ – ADMINISTRARE CUTANATĂ. EXPERIMENT EFECTUAT TIMP DE 90 DE ZILE ASUPRA UNOR ROZĂTOARE
- B.29. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 90 DE ZILE
- B.30. STUDII DE TOXICITATE CRONICĂ
- B.31. STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII INTRAUTERINE
- B.32. STUDII DE CARCINOGENITATE
- B.33. STUDII COMBinate DE TOXICITATE CRONICĂ ȘI DE CARCINOGENITATE
- B.34. STUDIU DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA O GENERAȚIE
- B.35. STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA A DOUĂ GENERAȚII
- B.36. TOXICOCINETICĂ
- B.37. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE DUPĂ EXPUNERE ACUTĂ
- B.38. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE – STUDIU CU ADMINISTRARE ÎN MOD REPETAT PE O DURATĂ DE 28 DE ZILE
- B.39. TEST *IN VIVO* DE SINTEZĂ NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS) PE CELULE HEPATICE DE MAMIFERE
- B.40. COROZIUNEA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL REZISTENȚEI ELECTRICE TRANSCUTANATE (RET)
- B.40 BIS. COROZIUNEA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTARE PE UN MODEL DE PIELE UMANĂ

**▼B**

- B.41. TESTUL DE FOTOTOXICITATE 3T3 NRU *IN VITRO*
- B.42. SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONII LIMFATICI
- B.43. STUDII DE NEUROTOXICITATE PE ROZĂTOARE
- B.44. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA *IN VIVO*
- B.45. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA DE TESTARE *IN VITRO*
- B.46. IRITAȚIA CUTANATĂ *IN VITRO*: TEST PE MODEL DE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ
- B.47. METODA DE TESTARE A OPACITĂȚII ȘI PERMEABILITĂȚII CORNEENE LA BOVINE PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV SAU UN POTENȚIAL IRTANT SEVER LA NIVEL OCULAR
- B.48. DE TESTARE A OCHIULUI IZOLAT DE PUI PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV ȘI UN POTENȚIAL IRTANT SEVER LA NIVEL OCULAR
- B.49. TESTUL *IN VITRO* DE MICRONUCLEE PE CELULE DE MAMIFERE
- B.50. SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: DA
- B.51. SENSIBILIZARE DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: BrdU-ELISA
- B.52. TOXICITATE ACUTĂ PRIN INHALARE – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ
- B.53. STUDIU DE NEUROTOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII
- B.54. BIOTESTUL UTEROTROFIC LA ROZĂTOARE: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI ESTROGENICE
- B.55. BIOTESTUL HERSHBERGER LA ȘOBOLANI: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI (ANTI)ANDROGENICE
- B.56. STUDIU EXTINS DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE O GENERAȚIE
- B.57. TESTUL DE STEROIDOGENEZĂ A H295R
- B.58. TESTE DE MUTAȚIE GENETICĂ PRIVIND CELULELE GERMINALE ȘI SOMATICE LA ROZĂTOARE TRANSGENICE

**▼B****INTRODUCERE GENERALĂ****A. CARACTERIZAREA SUBSTANȚEI ANALIZATE**

Înainte de începerea oricărui studiu de toxicitate, trebuie să fie cunoscute compoziția substanței, inclusiv principalele sale impurități, proprietățile sale fizice și chimice, între care și stabilitatea sa.

Proprietățile fizice și chimice ale substanței furnizează informații importante cu privire la alegerea căii de administrare, cu privire la conceperea unor studii, precum și cu privire la manipularea și stocarea substanței.

Dezvoltarea unei metode de analiză care să permită o evaluare calitativă și cantitativă a substanței testate (inclusiv a principalelor sale impurități, dacă este posibil), în vehiculul de administrare și în materialul biologic, trebuie să precedă efectuarea studiului.

Toate informațiile privind identificarea, proprietățile fizice și chimice, puritatea și comportamentul substanței testate trebuie înregistrate în raportul de testare.

**B. ÎNGRIJIREA ANIMALELOR**

În cadrul testelor de toxicitate se va proceda în mod obligatoriu la controlarea condițiilor de mediu și se vor utiliza tehnici adecvate de îngrijire a animalelor.

**(i) Condiții de adăpostire**

Condițiile de mediu în spațiile sau incintele rezervate animalelor experimentale trebuie să fie adaptate speciei utilizate. La șobolani, la șoareci și la cobai temperatura ambiantă trebuie să fie de  $22 \pm 3$  °C, iar umiditatea relativă trebuie să fie de 30-70 %; la iepuri, temperatura ambiantă trebuie să fie de  $20 \pm 3$  °C, iar umiditatea relativă trebuie să fie de 30-70 %.

Unele tehnici de testare sunt deosebit de sensibile la efectele termice; în asemenea cazuri indicații exacte sunt menționate în descrierea metodei de testare, cu privire la condițiile adecvate. În toate testele de toxicitate, temperatura și umiditatea trebuie controlate și înregistrate și trebuie să figureze în raportul final al studiului.

Alternarea de 12 de ore de lumină și de 12 de ore de întuneric va fi asigurată de iluminarea artificială. Detaliile cu privire la iluminare trebuie să fie înregistrate în raportul final al studiului.

Dacă metoda adoptată nu prevede alte condiții, animalele trebuie să fie adăpostite individual sau în grupuri mici de același sex în cuști. În cazul cuștilor colective nu se poate depăși numărul de cinci animale.

Este important ca rapoartele testelor efectuate pe animale să precizeze tipul de cuști utilizate și numărul de animale pe cuști, în momentul expunerii la substanța chimică și pe toată perioada de observație care urmează după test.

**▼B****(ii) Condiții de hrănire**

Regimul alimentar trebuie să aibă în vedere toate necesitățile nutriționale ale speciei supuse testului. În cazul în care substanțele sunt administrate prin hrană, este posibil ca valoarea nutrițională a hranei să fie diminuată printr-o interacțiune dintre substanță și un ingredient al hranei. Această eventualitate trebuie luată în considerare în momentul interpretării rezultatelor testului. Regimurile alimentare clasice folosite în laboratoare sunt acceptabile, apa de băut trebuie furnizată în mod nelimitat. Alegerea regimului alimentar poate fi ghidată de necesitatea de a garanta o proporție adecvată de substanță în cazul alegerii acestei căi de administrare.

Substanțele contaminante din alimentație care au un efect asupra toxicității nu trebuie să fie prezente în concentrații susceptibile de a influența rezultatele.

**C. METODE ALTERNATIVE**

Unul dintre obiectivele Uniunii Europene este promovarea dezvoltării și validării unor metode alternative care să furnizeze aceeași cantitate de informații ca testele actuale efectuate pe animale, dar pentru care să se necesite un număr mai redus de animale, care să minimizeze suferințele animalelor și să permită evitarea sacrificării acestora.

Din momentul în care asemenea metode sunt disponibile, ele trebuie avute în vedere ori de câte ori este posibil, în vederea caracterizării riscurilor, în vederea clasificării și etichetării substanțelor în funcție de riscurile intrinseci.

**D. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA**

Extrapolarea directă la om a rezultatelor testelor efectuate asupra animalelor și a testelor *in vitro* nu este posibilă decât în anumite limite; acest lucru trebuie avut în vedere cu ocazia evaluării și interpretării rezultatelor testelor; pe de altă parte, atunci când au fost observate efecte nedorite la om, aceste informații pot fi folosite în vederea confirmării rezultatelor testelor.

**E. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Majoritatea metodelor prezentate mai sus sunt elaborate în cadrul programului OCDE cu privire la principiile de testare, și trebuie puse în aplicare în conformitate cu principiile de bună practică de laborator, astfel încât să se garanteze recunoașterea reciprocă a datelor.

Informații suplimentare pot fi obținute din referințele citate în cadrul principiilor de bază ale OCDE, precum și din bibliografia de specialitate.

**▼B****B.1 bis. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – PROCEDURA CU DOZĂ FIXĂ****1. METODĂ**

Acest test este echivalent cu Orientarea 420 (2001) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Metodele tradiționale de evaluare a toxicității acute utilizează ca punct final decesul animalelor. În 1984, British Toxicology Society a sugerat o nouă abordare pentru testarea toxicității acute, pe baza administrării unei serii de doze fixe (1). Această abordare evita uciderea animalelor ca punct final, bazându-se pe observarea unor semne clare de toxicitate la una dintre seriile de doze fixe. În urma unor studii de validare *in vivo*, britanice (2) și internaționale (3), procedura a fost adoptată ca metodă de testare în 1992. Ulterior, proprietățile statistice ale procedurii cu doză fixă au fost evaluate utilizând modele matematice într-o serie de studii (4) (5) (6). Împreună, studiile *in vivo* și cele de modelare au demonstrat că procedura este reproductibilă, utilizează mai puține animale și cauzează mai puțină suferință decât metodele tradiționale și poate fi utilizată pentru clasificarea substanțelor într-un mod similar cu celelalte metode de testare a toxicității acute.

Indicații pentru selectarea celei mai adecvate metode de testare pentru un anumit scop sunt prezentate în Liniile directoare privind testarea toxicității acute orale (7). Liniile directoare în cauză conțin, de asemenea, informații suplimentare privind aplicarea și interpretarea metodei de testare B.1 bis.

Ca un principiu al metodei, în studiul principal se utilizează exclusiv doze cu un nivel mediu de toxicitate și se evită administrarea dozelor care se estimează că sunt letale. De asemenea, nu este necesar să se administreze dozele despre care se știe că provoacă dureri și suferințe grave din cauza acțiunilor corozive și puternic iritante. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicații pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unor linii directoare separate (8).

Metoda furnizează informații privind proprietățile periculoase și permite clasificarea substanței în conformitate cu Sistemul global armonizat (SGA) de clasificare a substanțelor chimice care cauzează toxicitate acută (9).

Laboratorul care efectuează testul ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Printre aceste informații se numără identitatea și structura chimică a substanței; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* asupra substanței; date toxicologice privind substanțele înrudite structural și utilizarea sau utilizările anticipate ale substanței. Aceste informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și vor contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Toxicitate orală acută:** efectele adverse care intervin după administrarea orală a unei singure doze dintr-o substanță sau a mai multor doze în cursul a 24 de ore.

**Deces întârziat:** un animal nu moare și nu pare muribund în termen de 48 ore, dar moare în perioada de observație de 14 zile.

**Doză:** cantitatea administrată din substanța de testat. Doza se exprimă ca greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (de exemplu mg/kg).

**Toxicitate evidentă:** termen general care descrie semne clare de toxicitate apărute după administrarea substanței de testat (a se vedea referința 3 pentru exemple), pe baza cărora se poate estima că următoarea doză fixă mai mare ar putea provoca dureri mari și semne persistente de suferință profundă, o stare muribundă [criteriile sunt prezentate în *Humane Endpoints Guidance Document* (8)] sau, probabil, decesul celor mai multe dintre animale.

**SGA:** Sistem global armonizat de clasificare a substanțelor și amestecurilor chimice. O activitate comună a OCDE (sănătatea oamenilor și mediul) a Comitetului de experți ONU pentru transportul bunurilor periculoase (proprietăți fizico-chimice) și a OIM (comunicarea pericolelor) și coordonată de Programul interorganizațional pentru buna gestionare a substanțelor chimice (IOMC).

**Deces iminent:** se așteaptă o stare muribundă sau decesul înainte de următorul moment de observare planificat. Printre semnele care indică această stare la rozătoare s-ar putea număra convulsii, poziție laterală, poziția culcată și tremurat [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

**LD<sub>50</sub> (doza letală mediană):** o singură doză de substanță, derivată statistic, care se poate estima că va cauza decesul a 50 % dintre animale dacă este administrată pe cale orală. Valoarea LD<sub>50</sub> se exprimă în greutatea de substanță de testat pe unitate de greutate a animalului de experiență (mg/kg).

**Doză-limită:** o doză la limita superioară a testării (2 000 sau 5 000 mg/kg).

**Stare muribundă:** starea precedentă decesului sau incapacitatea de a supraviețui, chiar în cazul administrării unui tratament [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

**Deces previzibil:** prezența semnelor clinice care indică decesul într-un moment cunoscut din viitor, înainte de sfârșitul planificat al experimentului, ca de exemplu: incapacitatea de a ajunge la apă și mâncare [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

**▼B****1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Unor grupuri de animale de același sex li se administrează doze fixe de 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg într-o procedură secvențială (în mod excepțional, poate fi luată în considerare o doză fixă suplimentară de 5 000 mg/kg, a se vedea punctul 1.6.2). Doza inițială se selectează pe baza unui studiu de observare pentru identificarea dozei care se presupune că produce unele semne de toxicitate fără a cauza efecte toxice grave sau decesul. Manifestările clinice și efectele asociate durerii, suferinței și decesului iminent sunt descrise detaliat într-un document de orientare OCDE (8). Altor grupuri de animale li se pot administra doze fixe mai mari sau mai mici, în funcție de prezența sau absența semnelor de toxicitate sau mortalitate. Această procedură continuă până la doza care provoacă toxicitate evidentă sau decesul unui singur animal, dacă nu se observă efecte la cea mai mare doză sau dacă decesul survine la cea mai mică doză.

**1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.4.1. Selectarea speciei de animale**

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În mod normal, se utilizează femele (7). Acest lucru este motivat de faptul că studiile din literatură asupra testelor convenționale LD<sub>50</sub> arată că, de obicei, diferențele de sensibilitate între sexe sunt mici, dar în cazurile în care se observă diferențe, femelele sunt, în general, puțin mai sensibile (10). Cu toate acestea, în cazul în care informațiile privind proprietățile toxicologice sau toxicocinetice ale unor substanțe chimice înrudite structural arată că este probabil ca masculii să fie mai sensibili, se utilizează acest sex. Dacă testul se efectuează pe masculi, se oferă justificări adecvate.

Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase provenind din liniile utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. La începerea testului, fiecare animal trebuie să aibă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea sa trebuie să se situeze într-un interval de  $\pm 20\%$  față de greutatea medie a animalelor testate anterior.

**1.4.2. Condiții de adăpostire și hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm 3$  °C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal.

**1.4.3. Pregătirea animalelor**

Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cu cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.



## ▼B

1.4.4. **Pregătirea dozelor**

În general, substanțele de testat se administrează într-un volum constant indiferent de dozele testate, variindu-se concentrația preparatului. În cazul testării unui produs sau amestec final lichid, utilizarea substanței de testat nediluate, și anume la o concentrație constantă, poate fi mai relevantă pentru evaluarea ulterioară a riscurilor substanței și este impusă de unele autorități de reglementare. În orice caz, nu trebuie depășit volumul dozei maxime de administrat. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. La rozătoare, volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală; cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase, pot fi administrați 2 ml/100 g greutate corporală. În ceea ce privește forma de preparare a dozei, se recomandă utilizarea, ori de câte ori este posibil, a unei soluții/suspensii/emulsii apoase, urmată, în ordinea preferinței, de o soluție/suspensie/emulsie în ulei (de exemplu, în ulei de porumb) și, eventual, soluții în alte vehicule. Pentru vehicule altele decât apa, este necesar să se cunoască caracteristicile toxicologice ale vehiculului. Dozele se prepară cu puțin timp înaintea administrării, cu excepția cazului în care stabilitatea preparatului în perioada în care urmează a fi utilizat este cunoscută și s-a demonstrat că este acceptabilă.

1.5. **MOD DE LUCRU**1.5.1. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează într-o singură doză, prin gavaj, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. În cazurile deosebite în care nu este posibilă administrarea unei singure doze, doza poate fi administrată în fracțiuni mai mici pe parcursul unei perioade de maximum 24 de ore.

Animalele nu se hrănesc înainte de administrarea dozei (de exemplu, șobolanii nu trebuie să fie hrăniți peste noapte, dar pot primi apă; șoarecii nu trebuie să fie hrăniți, dar pot primi apă, cu 3-4 ore înainte). După perioada de flămânzire, animalele se cântăresc și se administrează substanța de testat. După administrarea substanței, animalele pot fi private din nou de hrană, 3-4 ore la șobolani și 1-2 ore la șoareci. Dacă doza se administrează fracționat într-o perioadă de timp, este posibil să fie necesar să li se ofere animalelor hrană și apă, în funcție de durata perioadei de administrare.

1.5.2. **Studiu de observare**

Scopul studiului de observare este de a permite selectarea dozei inițiale adecvate pentru studiul principal. Substanța de testat se administrează, într-o procedură secvențială, câte unui animal, conform diagramelor din apendicele 1. Studiul de observare este finalizat când se poate lua o decizie privind doza inițială pentru studiul principal (sau dacă survine decesul unui animal la cea mai mică doză fixă).

Doza inițială pentru studiul de observare se selectează dintre dozele fixe de 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg ca doza care se așteaptă că provoacă toxicitate evidentă, dacă este posibil, pe baza datelor obținute *in vivo* și *in vitro* pentru aceeași substanță chimică sau alte substanțe înrudite structural. În absența acestor informații, doza inițială va fi de 300 mg/kg.

Dozele se administrează la un interval de minimum 24 de ore pentru fiecare animal. Toate animalele trebuie observate cel puțin 14 zile.

## ▼B

În mod excepțional și doar dacă acest lucru este necesar pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi administrată o doză suplimentară mai mare, de 5 000 mg/kg (a se vedea apendicele 3). Din motive justificate de bunăstarea animală, testarea pe animale a substanțelor din categoria 5 SGA (2 000-5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor, a sănătății animale sau a mediului.

În cazurile în care un animal căruia i s-a administrat doza fixă cea mai redusă (5 mg/kg) în cadrul studiului de observare moare, procedura normală este de a încheia studiul și de a încadra substanța în categoria 1 SGA (conform anexei 1). Cu toate acestea, dacă este necesară o confirmare suplimentară a clasificării, se poate aplica o procedură suplimentară opțională, descrisă în continuare. Se administrează o doză de 5 mg/kg unui alt animal. Dacă și al doilea animal moare, se confirmă categoria 1 SGA, iar studiul se încheie imediat. Dacă al doilea animal supraviețuiește, se administrează o doză de 5 mg/kg unui nou grup, de maximum 3 animale. Deoarece riscul de mortalitate este foarte ridicat, dozele vor fi administrate secvențial, pentru protecția bunăstării animale. Intervalul de timp între administrarea dozelor la fiecare animal trebuie să fie suficient pentru a stabili probabilitatea ca animalul anterior să supraviețuiască. Dacă survine decesul unui alt animal, secvența de administrare se încheie imediat, fără testarea pe alte animale. Deoarece decesul celui de-al doilea animal (indiferent de numărul de animale testate în momentul încheierii studiului) se încadrează în rezultatul A (2 sau mai multe decese), se aplică regula de clasificare din apendicele 2 la o doză fixă de 5 mg/kg (categoria 1, dacă survin două sau mai multe decese, sau categoria 2 dacă survine un singur deces). În plus, apendicele 4 oferă indicații pentru clasificarea în sistemul UE, până la punerea în aplicare a noului SGA.

### 1.5.3. Studiul principal

#### 1.5.3.1. Numărul de animale și nivelul dozelor

Acțiunile care se întreprind după administrarea dozei inițiale sunt indicate în diagramele din apendicele 2. Se adoptă unul dintre cele trei cursuri de acțiune: fie se oprește testarea și se atribuie clasa adecvată de clasificare a pericolozității, fie se continuă testarea cu o doză fixă mai mare sau cu o doză fixă mai mică. Cu toate acestea, pentru a proteja animalele, o doză care a cauzat decesul animalelor în studiul de observare nu va fi reutilizată în studiul principal (a se vedea apendicele 2). Experiența a demonstrat că, cel mai probabil, după administrarea dozei inițiale, substanța va putea fi clasificată și nu vor fi necesare teste suplimentare.

În mod normal, se utilizează un număr total de cinci animale de același sex pentru fiecare nivel investigat al dozei. Grupul de cinci animale va fi format dintr-un animal căruia i s-a administrat doza selectată în studiul de orientare și alte patru animale (cu excepția cazului excepțional în care nivelul dozei utilizat în studiul principal nu a fost inclus în studiul de orientare).

Intervalul de timp dintre administrarea dozelor de la fiecare nivel la fiecare animal se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Administrarea următoarei doze se amână până când există certitudinea că animalele testate anterior vor supraviețui. Se recomandă un interval de 3 sau 4 zile între administrarea fiecărui nivel, pentru a permite observarea toxicității întârziate. Intervalul de timp poate fi adaptat după caz, de exemplu în cazul unor rezultate neconcludente.

**▼B**

Dacă se ia în considerare utilizarea dozei fixe maxime de 5 000 mg/kg, se aplică procedura prevăzută în apendicele 3 (a se vedea, de asemenea, punctul 1.6.2).

#### 1.5.3.2. *Testul-limită*

Testul-limită se utilizează în special în situațiile în care experimentatorul are informații care arată că este posibil ca materialul testat să nu fie toxic, având o toxicitate puțin peste dozele-limită reglementate. Informațiile privind toxicitatea materialului de testat pot fi deduse din cunoștințele despre compuși, amestecuri și produse similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că materialul de testat este toxic, se efectuează testul principal.

Urmând procedura normală, un studiu de observare cu o doză inițială de 2 000 mg/kg (sau, în cazuri excepționale, 5 000 mg/kg), urmat de administrarea aceleași doze altor patru animale, constituie testul-limită conform acestei linii directoare.

### 1.6. OBSERVAȚII

Animalele sunt observate individual după administrarea dozelor, cel puțin o dată în primele 30 de minute, periodic în primele 24 de ore, acordându-li-se o atenție specială în primele 4 ore, și, ulterior, zilnic, timp de 14 zile, cu excepția cazului în care trebuie excluse din studiu și eutanasiate din motive de bunăstare animală sau sunt găsite moarte. Cu toate acestea, perioada de observație nu se stabilește rigid. Ea se determină în funcție de reacțiile toxice și momentul declanșării acestora și de durata perioadei de recuperare și, prin urmare, poate fi prelungită, dacă este necesar. Momentele în care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere (11). Toate observațiile se înregistrează sistematic, întocmindu-se fișe individuale pentru fiecare animal.

Vor fi necesare observații suplimentare în cazul în care animalele manifestă în continuare semne de toxicitate. Observațiile vizează modificările pielii și blănii, ochilor și membranelor mucoaselor, modificările activității sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos central și vegetativ și ale activității somatomotorii și modificările de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremurăturii, convulsiilor, salivării, diareei, letargiei, somnului și comei. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

#### 1.6.1. **Greutatea corporală**

Animalele se cântăresc puțin înainte de administrarea substanței de testat și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Se calculează și se înregistrează variațiile de greutate. La sfârșitul testului, animalele care au supraviețuit sunt cântărite și apoi eutanasiate.

**▼B****1.6.2. Patologie**

Toate animalele participante la test (inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din motive de bunăstare animală) sunt supuse unei autopsii macroscopice. Se înregistrează toate modificările patologice majore intervenite la fiecare animal. Se poate efectua, de asemenea, o examinare microscopică a organelor care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore de la administrarea dozei inițiale, întrucât ar putea furniza informații utile.

**2. DATE**

Se furnizează date individuale despre animale. În plus, se face un rezumat tabelar al tuturor datelor, prezentând pentru fiecare grup testat, numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Substanța de testat:

- natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);
- date de identificare, inclusiv numărul CAS.

Vehicul (dacă este cazul):

- justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

Animalele de experiență:

- specie/sușă utilizată;
- starea microbiologică a animalelor, dacă se cunoaște;
- numărul, vârsta și sexul animalelor (inclusiv, dacă este cazul, o justificare pentru utilizarea de masculi în locul femelelor);
- sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;

Condiții de testare:

- detalii privind prepararea substanței de testat, inclusiv detalii privind forma fizică a materialului administrat;
- detalii privind administrarea substanței de testat, inclusiv volumul dozelor și durata administrării;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa hranei, sursa apei);
- o justificare pentru selectarea dozei inițiale.

**▼B**

Rezultate:

- un tabel cu datele privind reacția și nivelul dozei la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);
- un tabel cu greutatea corporală și variațiile acesteia;
- greutatea fiecărui animal în ziua administrării dozei, la intervale săptămânale ulterioare și în momentul morții sau al eutanasierii;
- data și ora morții, dacă a survenit înainte de momentul planificat pentru sacrificare;
- graficul declanșării semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;
- concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

Concluzii.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

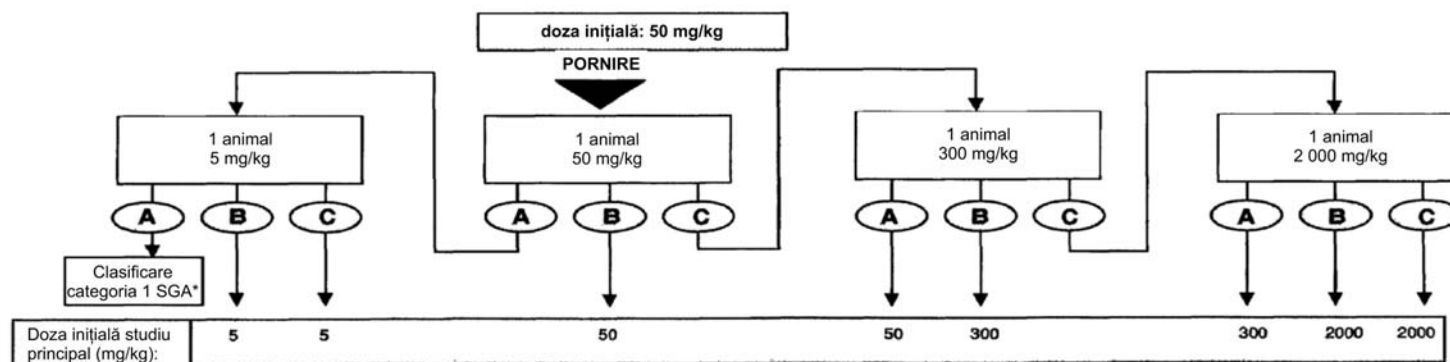
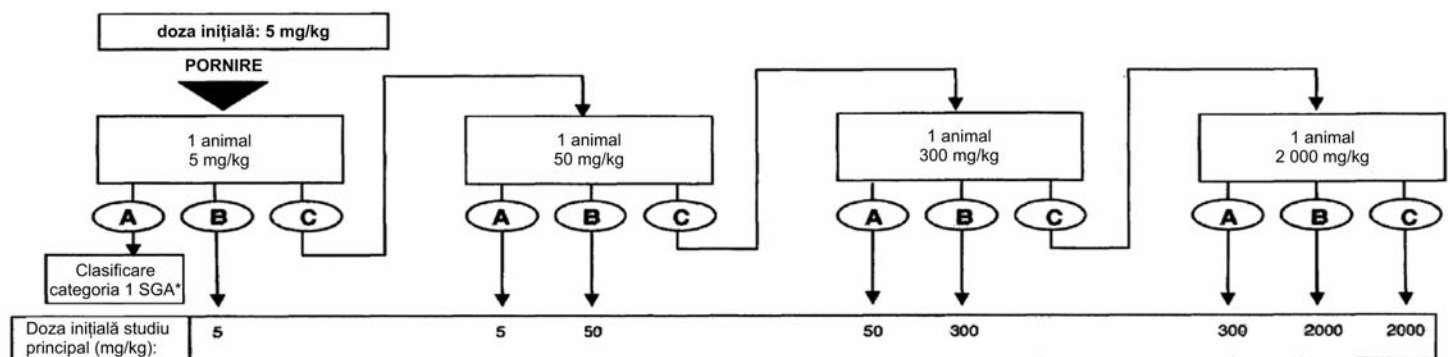
1. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, p. 85-92.
2. Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, p. 279-291.
3. Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, p. 469-482.
4. Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, p. 313-324.
5. Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, p. 183-196.
7. OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

**▼B**

9. OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
10. Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, p. 223-231.
11. Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3<sup>rd</sup> Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

APENDICELE 1

DIAGRAMA PENTRU STUDIUL DE OBSERVARE



**Rezultat**

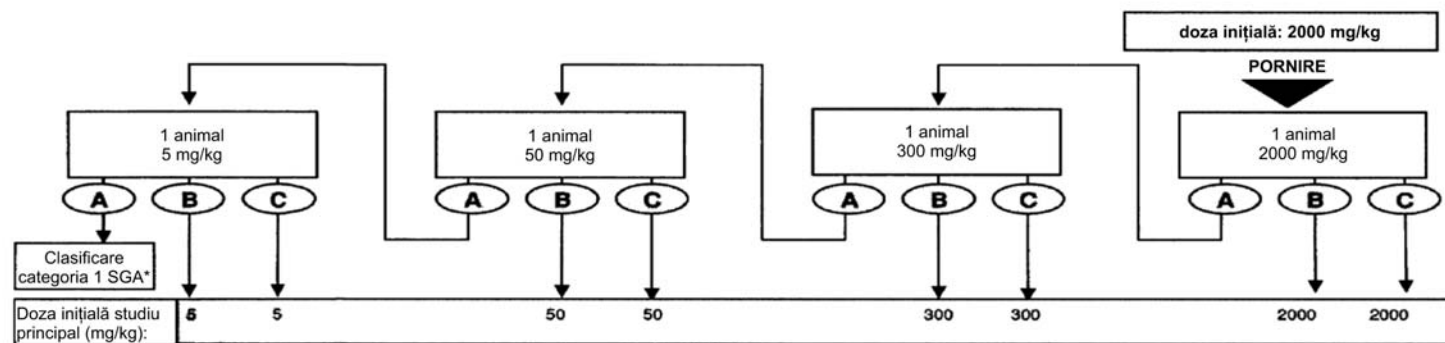
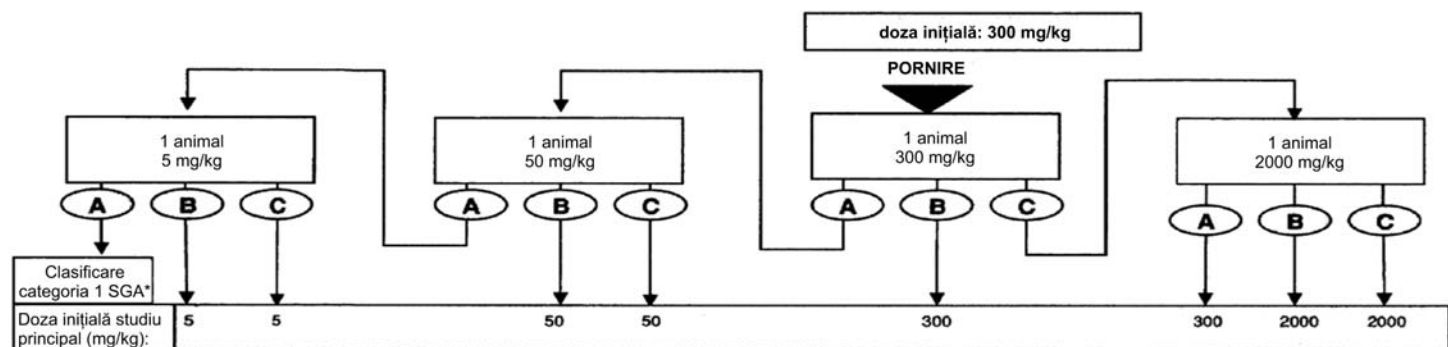
**A** deces

**B** toxicitate evidentă

**C** niciun semn de toxicitate evidentă și  
niciun deces

\* pentru rezultatul **A** la 5 mg/kg există o procedură  
opțională suplimentară pentru confirmarea clasificării SGA: a  
se vedea secțiunea 1.5.2.

▼B



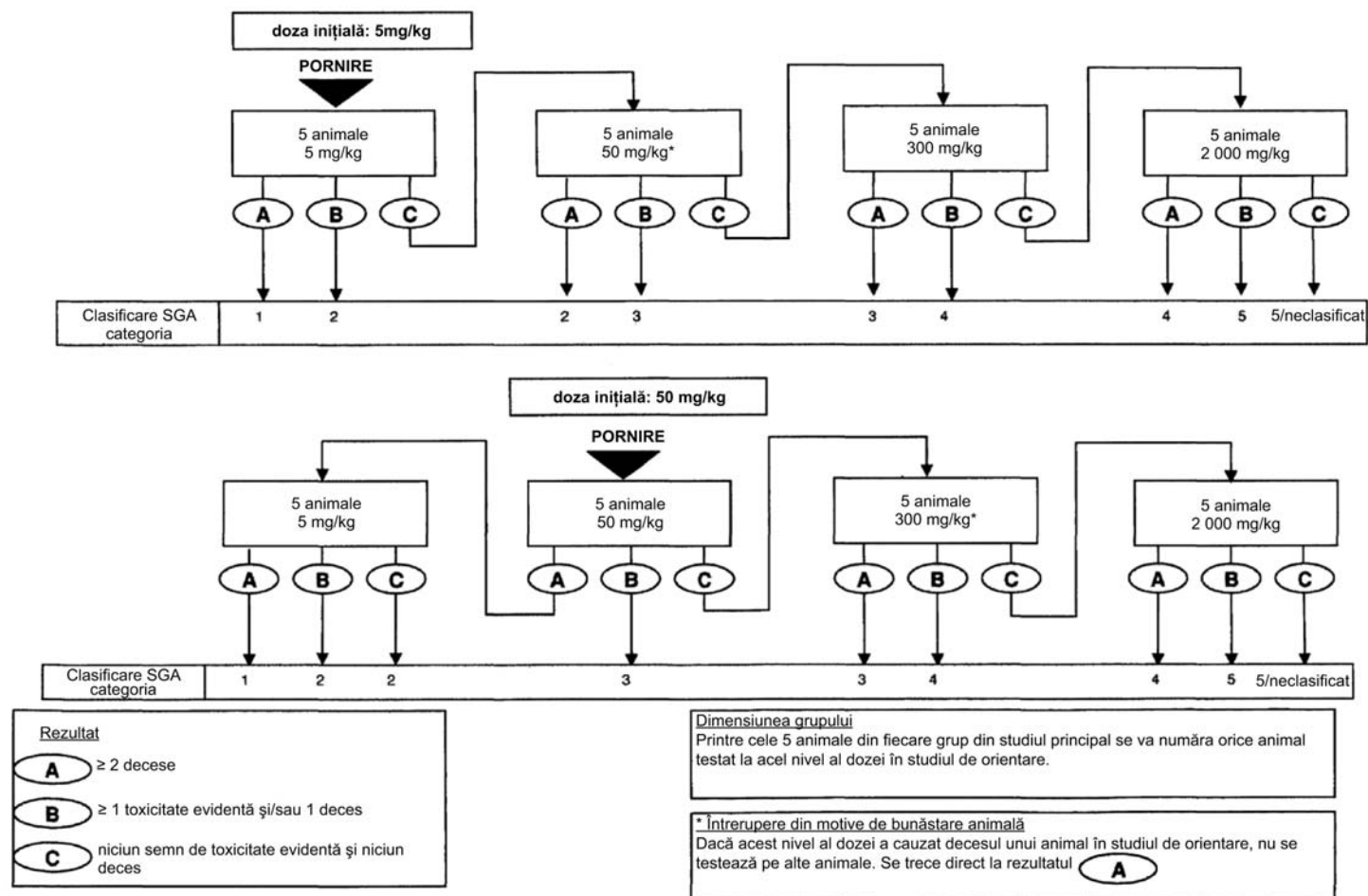
| Rezultat |  |
|----------|--|
| <b>A</b> | deces  |
| <b>B</b> | toxicitate evidentă                                |
| <b>C</b> | niciun semn de toxicitate evidentă și niciun deces |

\* pentru rezultatul **A** la 5 mg/kg există o procedură opțională suplimentară pentru confirmarea clasificării SGH: a se vedea secțiunea 1.5.2.

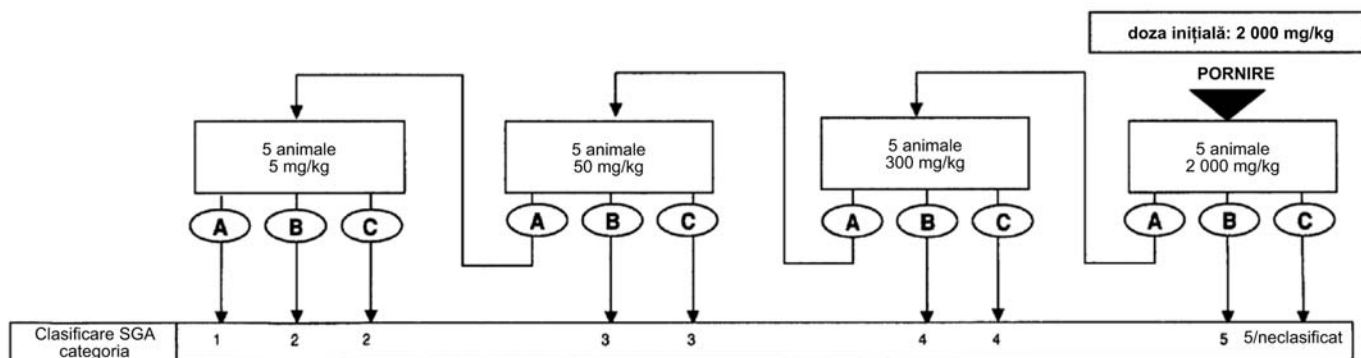
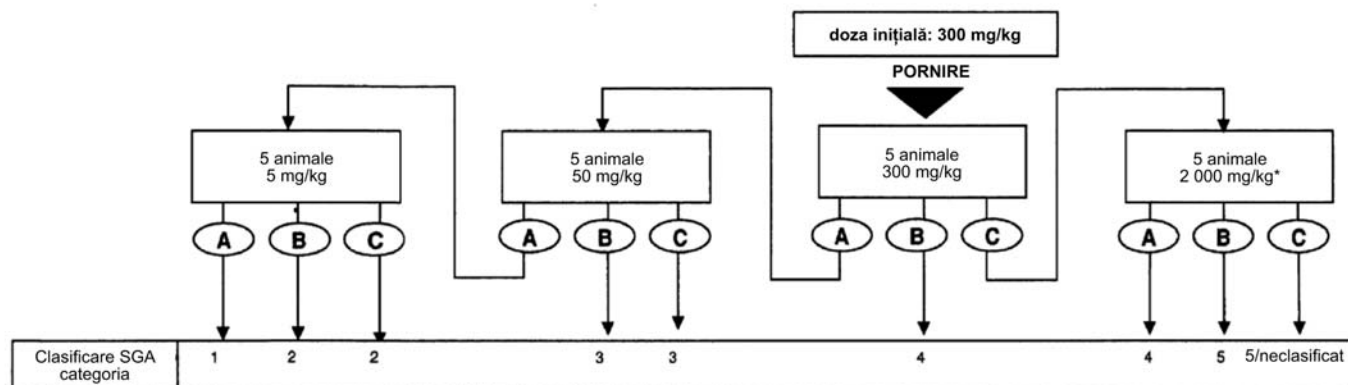


APENDICELE 2

DIAGRAMA PENTRU STUDIUL PRINCIPAL



▼B



|          |  |
|----------|--|
| Rezultat |  |
| <b>A</b> | ≥ 2 decese   |
| <b>B</b> | ≥ 1 toxicitate evidentă și/sau 1 deces             |
| <b>C</b> | Niciun semn de toxicitate evidentă și niciun deces |

|  |  |
|--|--|
| Dimensiunea grupului   |  |
| Printre cele 5 animale din fiecare grup din studiul principal se va număra orice animal testat la acel nivel al dozei în studiul de orientare.           |  |
| * Întrerupere din motive de bunăstare animală  |  |
| Dacă acest nivel al dozei a cauzat decesul unui animal în studiul de orientare, nu se testează pe alte animale. Se trece direct la rezultatul <b>A</b> . |  |



### APENDICELE 3

#### CRITERIILE PENTRU CLASIFICAREA SUBSTANȚELOR DE TESTAT CU VALORI ESTIMATE ALE LD<sub>50</sub> DE PESTE 2 000 MG/KG FĂRĂ A FI NECESARĂ TESTAREA

Criteriile pentru categoria de pericolozitate 5 au ca scop să permită identificarea substanțelor de testat care prezintă un pericol relativ scăzut de toxicitate acută, dar care, în anumite circumstanțe, pot prezenta pericole pentru populațiile vulnerabile. Se anticipează că aceste substanțe au o LD<sub>50</sub> orală și dermică între 2 000 și 5 000 mg/kg sau doze echivalente pentru alte căi de administrare. Substanța de testat se clasifică în categoria de pericolozitate definită prin: 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (categoria 5 din SGA) în următoarele cazuri:

- (a) dacă este încadrată în această categorie de oricare dintre diagramele de testare din apendicele 2, pe baza incidenței deceselor;
- (b) dacă sunt deja disponibile date fiabile care arată că LD<sub>50</sub> se situează în limitele categoriei 5 sau alte studii pe animale sau privind efectele toxice asupra oamenilor indică o problemă acută pentru sănătatea oamenilor;
- (c) prin extrapolare, estimare sau măsurarea de date, dacă nu se justifică clasificarea într-o clasă de pericolozitate mai mare; și
  - sunt disponibile informații fiabile privind efecte toxice semnificative asupra oamenilor; sau
  - se observă decese la testarea până la valorile din categoria 4 pe cale orală; sau
  - dacă concluziile unor experți confirmă semne clinice semnificative de toxicitate, la testarea până la valorile din categoria 4, cu excepția diareii, piloereției sau a aspectului neîngrijit; sau
  - dacă concluziile experților confirmă informații fiabile care indică potențiale efecte acute semnificative conform altor studii asupra animalelor.

#### TESTAREA CU DOZE PESTE 2 000 MG/KG

În mod excepțional și exclusiv în cazurile în care este justificată pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi luată în considerare utilizarea unei doze fixe mai mari, de 5 000 mg/kg. Recunoscând necesitatea de a proteja bunăstarea animală, testarea cu 5 000 mg/kg este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie direct relevante pentru protecția sănătății animale sau a sănătății oamenilor (9).

#### Studiul de observare

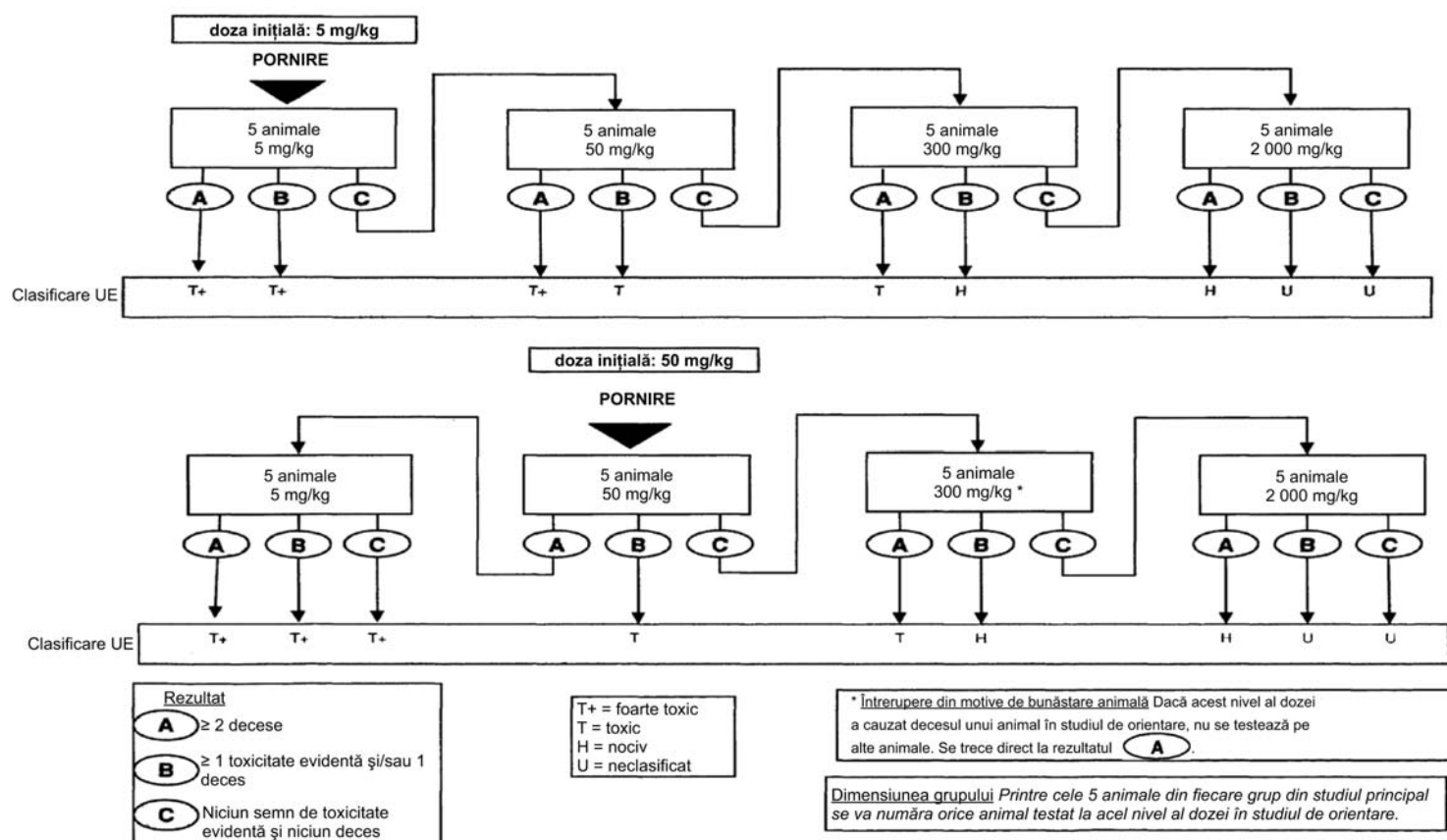
Regulile de luare a deciziilor pentru procedura secvențială prezentată în apendicele 1 sunt extinse pentru a include doza de 5 000 mg/kg. Astfel, dacă într-un studiu de observare se utilizează o doză inițială de 5 000 mg/kg, rezultatul A (deces) impune testarea unui alt animal la 2 000 mg/kg; rezultatele B și C (toxicitate evidentă sau fără semne de toxicitate) permit selectarea dozei de 5 000 mg/kg ca doză inițială pentru studiul principal. În mod similar, dacă se folosește o altă doză decât 5 000 mg/kg, testarea va avansa la 5 000 mg/kg în cazul în care se obțin rezultatele B sau C la 2 000 mg/kg: un rezultat ulterior A, la o doză de 5 000 mg/kg, va impune o doză inițială pentru studiul principal de 2 000 mg/kg, iar rezultatele B și C vor impune o doză inițială pentru studiul principal de 5 000 mg/kg.

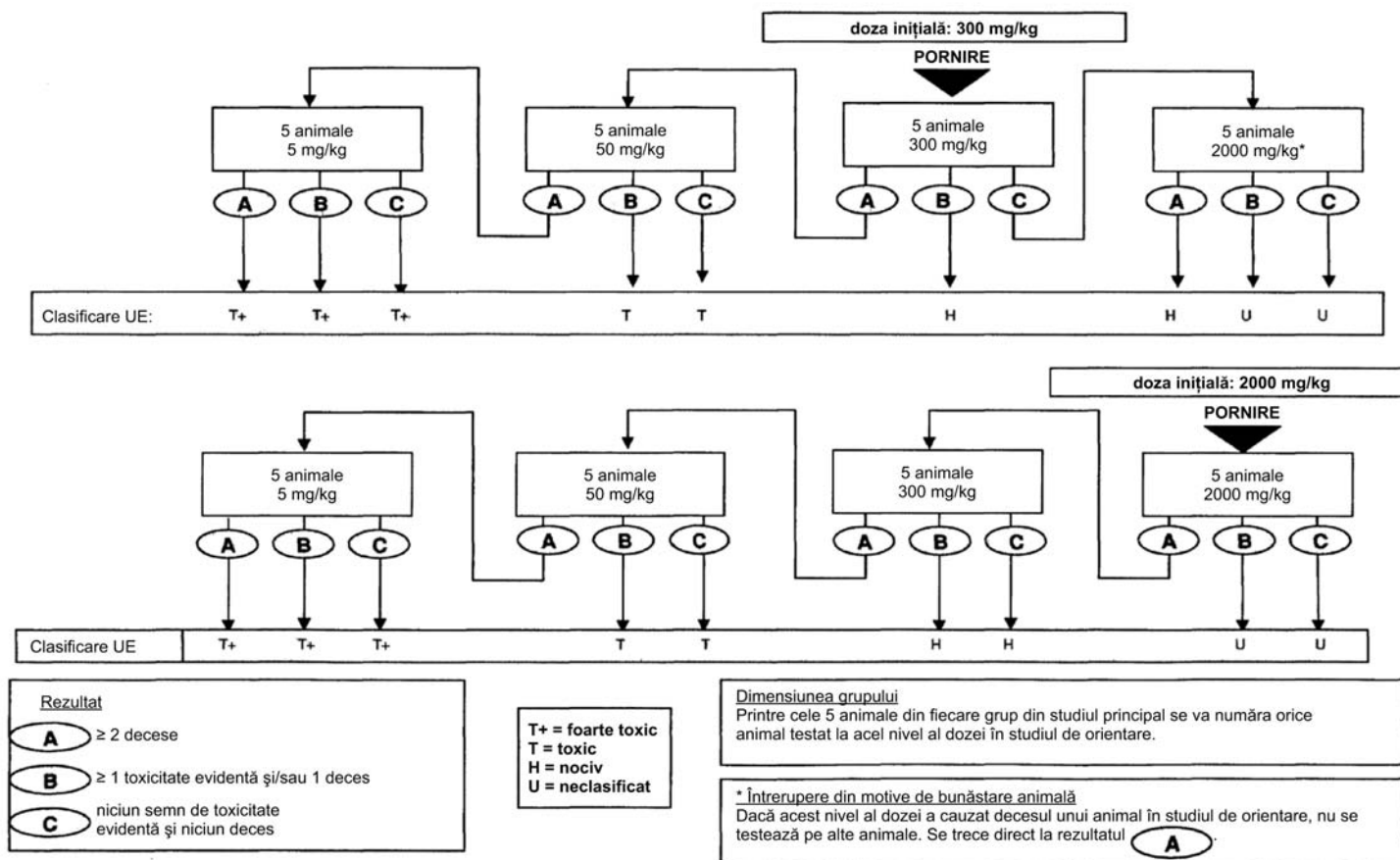
**▼B****Studiul principal**

Regulile de luare a deciziilor pentru procedura secvențială prezentată în apendicele 2 sunt extinse pentru a include doza de 5 000 mg/kg. Astfel, dacă doza inițială pentru studiul principal este de 5 000 mg/kg, rezultatul A ( $\geq 2$  decese) va impune testarea unui al doilea grup la 2 000 mg/kg; rezultatul B (toxicitate evidentă și/sau  $\leq 1$  deces) sau C (fără semne de toxicitate) va conduce la neclasificarea conform SGA. În mod similar, dacă se utilizează o doză inițială alta decât cea de 5 000 mg/kg, testarea continuă cu 5 000 mg/kg în cazul obținerii rezultatului C la 2 000 mg/kg; un rezultat ulterior A, la doza de 5 000 mg/kg, va conduce la clasificarea substanței în categoria 5 SGA, iar rezultatele B sau C vor conduce la neclasificarea substanței.

## METODA DE TESTARE B.1 bis

Linii directoare pentru clasificarea conform schemei UE pentru perioada de tranziție până la punerea completă în aplicare a Sistemului global armonizat de clasificare (SGA) (preluate din referința 8)





**▼B****B.1 tris. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 423 (2001) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Metoda clasei de toxicitate acută (1) prezentată în acest test este o procedură secvențială care utilizează 3 animale de același sex într-o etapă. În funcție de mortalitatea și/sau starea muribundă a animalelor, pot fi necesare, în medie, 2-4 etape pentru a permite determinarea toxicității acute a substanței de testat. Această procedură este reproductibilă, utilizează foarte puține animale și permite clasificarea substanțelor într-un mod similar cu celelalte metode de testare a toxicității acute. Metoda clasei de toxicitate acută se bazează pe evaluări biometrice (2) (3) (4) (5) cu doze fixe, separate adecvat pentru a permite clasificarea unei substanțe pentru includerea în diverse categorii și evaluarea riscurilor. Metoda, adoptată în 1996, a fost validată intens *in vivo* comparativ cu datele LD<sub>50</sub> obținute din literatură, atât la nivel național (6), cât și la nivel internațional (7).

Pentru indicații privind selectarea celei mai adecvate metode de testare pentru un anumit scop, consultați *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (8). Acest document conține, de asemenea, informații suplimentare pentru aplicarea și interpretarea metodei de testare B.1 tris.

Nu este necesar să se administreze substanțele de testat la doze despre care se știe că provoacă dureri mari și suferințe profunde din cauza acțiunilor corozive și pronunțat iritante. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicații pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unor linii directoare separate (9).

Metoda utilizează doze predefinite, iar rezultatele permit clasarea și clasificarea unei substanțe în conformitate cu Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor chimice care provoacă toxicitate acută (10).

În principiu, această metodă nu are ca scop să permită calcularea unei valori exacte a LD<sub>50</sub>, dar permite determinarea nivelurilor definite de expunere letale, deoarece decesul unei proporții dintre animale rămâne principalul punct final al acestui test. Metoda permite determinarea unei valori a LD<sub>50</sub> doar dacă cel puțin două doze determină o mortalitate peste 0 %, dar mai mică decât 100 %. Utilizarea unor doze predefinite, indiferent de substanța de testat, și faptul că clasificarea se face explicit în funcție de numărul de animale observate în diverse stări favorizează consecvența și reproductibilitatea datelor prezentate de diverse laboratoare.

## ▼B

Laboratorul care efectuează testul ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Printre aceste informații se numără identitatea și structura chimică a substanței; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* asupra substanței; date toxicologice privind substanțele înrudite structural și utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) a(le) substanței. Aceste informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și va contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

## 1.2. DEFINIȚII

**Toxicitate orală acută:** se referă la efectele adverse care intervin după administrarea orală a unei singure doze dintr-o substanță sau a mai multor doze în cursul a 24 de ore.

**Deces întârziat:** înseamnă că un animal nu moare și nu pare muribund în termen de 48 ore, dar moare în perioada de observație de 14 zile.

**Doză:** este cantitatea administrată din substanța de testat. Doza se exprimă ca greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (de exemplu: mg/kg).

**SGA:** Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor și amestecurilor chimice. O activitate comună a OCDE (sănătatea oamenilor și mediul), a Comitetului de experți ONU pentru transportul bunurilor periculoase (proprietăți fizico-chimice) și a OIM (comunicarea pericolelor) și coordonată de Programul interorganizațional pentru buna gestionare a substanțelor chimice (IOMC).

**Deces iminent:** când se așteaptă o stare muribundă sau decesul înainte de următorul moment de observare planificat. Printre semnele care indică această stare la rozătoare s-ar putea număra convulsii, poziție laterală, poziția culcată și tremurat [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].

**LD<sub>50</sub> (doza letală mediană):** este o singură doză de substanță, derivată statistic, care se poate estima că va cauza decesul a 50 % dintre animale dacă este administrată pe cale orală. Valoarea LD<sub>50</sub> se exprimă în greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (mg/kg).

**Doză-limită:** se referă la o doză la limita superioară a testării (2 000 sau 5 000 mg/kg).

**Stare muribundă:** starea precedentă decesului sau incapacitatea de a supraviețui, chiar în cazul administrării unui tratament [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].

**Deces previzibil:** prezența semnelor clinice care indică decesul într-un moment cunoscut din viitor, înainte de sfârșitul planificat al experimentului, ca de exemplu: incapacitatea de a ajunge la apă și mâncare [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].



**▼B****1.3. PRINCIPIUL TESTULUI**

Principiul acestui test este că, prin aplicarea unei proceduri secvențiale, cu utilizarea unui număr minim de animale în fiecare etapă, se obțin informații suficiente privind toxicitatea acută a substanței de testat pentru a permite clasificarea acesteia. Substanța se administrează oral unui grup de animale de experiență, la una dintre dozele definite. Substanța se testează conform unei proceduri secvențiale, în fiecare etapă utilizându-se trei animale de același sex (de obicei, femele). Absența sau prezența mortalității cauzate de substanța de testat la animalele testate într-o etapă determină etapa următoare, astfel;

— nu sunt necesare alte teste;

— administrarea aceleiași doze altor trei animale;

— administrarea următoarei doze mai mari sau mai mici altor trei animale.

Detaliile procedurii de testare sunt prezentate în apendicele 1. Metoda permite adoptarea unei concluzii privind clasificarea substanței de testat într-una dintre clasele de toxicitate delimitate de valori prestabilite ale LD<sub>50</sub>.

**1.4. DESCRIEREA METODEI****1.4.1. Selectarea speciei de animale**

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În mod normal, se utilizează femele (9). Acest lucru este motivat de faptul că studiile din literatură asupra testelor convenționale LD<sub>50</sub> arată că, deși diferențele de sensibilitate între sexe sunt mici, în cazurile în care se observă diferențe, femelele sunt, în general, puțin mai sensibile (11). Cu toate acestea, în cazul în care informațiile privind proprietățile toxicologice sau toxicocinetice ale unor substanțe chimice înrudite structural arată că este probabil ca masculii să fie mai sensibili, se utilizează acest sex. Dacă testul se efectuează pe masculii, se oferă justificări adecvate.

Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase provenind din liniile utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. La începerea testului, fiecare animal trebuie să aibă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea sa trebuie să se situeze într-un interval de  $\pm 20\%$  față de greutatea medie a animalelor testate anterior.

**1.4.2. Condiții de adăpostire și hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm 3$  °C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal.

**▼B****1.4.3. Pregătirea animalelor**

Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cu cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

**1.4.4. Pregătirea dozelor**

În general, substanțele de testat se administrează într-un volum constant indiferent de dozele testate, variind concentrația preparatului. În cazul testării unui produs sau amestec final lichid, utilizarea substanței de testat nediluate, și anume la o concentrație constantă, poate fi mai relevantă pentru evaluarea ulterioară a riscurilor substanței și este impusă de unele autorități de reglementare. În orice caz, nu trebuie depășit volumul dozei maxime de administrat. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. La rozătoare, volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală; cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase, pot fi administrați 2 ml/100 g greutate corporală. În ceea ce privește forma de preparare a dozei, se recomandă utilizarea, ori de câte ori este posibil, a unei soluții/suspensii/emulsii apoase, urmată, în ordinea preferinței, de o soluție/suspensie/emulsie în ulei (de exemplu, în ulei de porumb) și, eventual, soluții în alte vehicule. Pentru vehicule altele decât apa, este necesar să se cunoască caracteristicile toxicologice ale vehiculului. Dozele se prepară cu puțin timp înaintea administrării, cu excepția cazului în care stabilitatea preparatului în perioada în care urmează a fi utilizat este cunoscută și s-a demonstrat că este acceptabilă.

**1.5. MOD DE LUCRU****1.5.1. Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează într-o singură doză, prin gavaj, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. În cazurile deosebite în care nu este posibilă administrarea unei singure doze, doza poate fi administrată în fracțiuni mai mici pe parcursul unei perioade de maximum 24 de ore.

Animalele nu se hrănesc înainte de administrarea dozei (de exemplu, șobolanii nu trebuie să fie hrăniți peste noapte, dar pot primi apă; șoarecii nu trebuie să fie hrăniți, dar pot primi apă, cu 3-4 ore înainte). După perioada de flămânzire, animalele se cântăresc și li se administrează substanța de testat. După administrarea substanței, animalele pot fi private din nou de hrană, 3-4 ore la șobolani și 1-2 ore la șoareci. Dacă doza se administrează fracționat într-o perioadă de timp, este posibil să fie necesar să li se ofere animalelor hrană și apă, în funcție de durata perioadei de administrare.

**1.5.2. Numărul de animale și nivelul dozelor**

În fiecare etapă se utilizează trei animale. Nivelul dozei utilizate ca doză inițială se selectează din cele patru doze fixe: 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg greutate corporală. Se alege nivelul dozei inițiale cu cea mai mare probabilitate de a produce decesul unora dintre animalele cărora li se administrează. Diagramele din apendicele 1 descriu procedura de urmat pentru fiecare doză inițială. În plus, apendicele 4 prezintă indicații pentru clasificarea în sistemul UE până la punerea în aplicare a noului SGA.

**▼B**

Dacă informațiile disponibile sugerează că este puțin probabil ca cel mai ridicat nivel al dozei inițiale (2 000 mg/kg greutate corporală) să provoace decese, se efectuează testul-limită. Dacă nu există informații privind substanța de testat, din motive de bunăstare animală, se recomandă utilizarea dozei inițiale de 300 mg/kg greutate corporală.

Intervalul de timp dintre administrarea dozelor diverselor grupuri se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Administrarea următoarei doze se amână până când există certitudinea că animalele testate anterior vor supraviețui.

În mod excepțional și doar dacă acest lucru este necesar pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi luată în considerare o doză suplimentară mai mare, de 5 000 mg/kg greutate corporală (a se vedea apendicele 2). Din motive de bunăstare animală, testarea pe animale a substanțelor din categoria 5 SGA (2 000-5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil că rezultatele acestor teste vor fi direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor, a sănătății animale sau a mediului.

### 1.5.3. Testul-limită

Testul-limită se utilizează în special în situațiile în care experimentatorul are informații care arată că este posibil ca materialul de testat să nu fie toxic, având o toxicitate puțin peste dozele-limită reglementate. Informațiile privind toxicitatea materialului de testat pot fi deduse din cunoștințele despre compuși, amestecuri și produse similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că materialul de testat este toxic, se efectuează testul principal.

Se poate efectua un test-limită cu o doză de 2 000 mg/kg greutate corporală pe șase animale (trei animale în fiecare etapă). În mod excepțional, se poate efectua un test-limită cu o doză de 5 000 mg/kg cu trei animale (a se vedea apendicele 2). Dacă intervin decese cauzate de substanța de testat, se poate dovedi necesară efectuarea de teste la următorul nivel inferior.

### 1.6. OBSERVAȚII

Animalele sunt observate individual după administrarea dozelor, cel puțin o dată în primele 30 de minute, periodic în primele 24 de ore, acordându-li-se o atenție specială în primele 4 ore, și, ulterior, zilnic, timp de 14 zile, cu excepția cazului în care trebuie excluse din studiu și eutanasiate din motive de bunăstare animală sau sunt găsite moarte. Cu toate acestea, perioada de observație nu se stabilește rigid. Ea se determină în funcție de reacțiile toxice și momentul declanșării acestora și de durata perioadei de recuperare și, prin urmare, poate fi prelungită, dacă este necesar. Momentele în care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere (12). Toate observațiile se înregistrează sistematic, întocmindu-se fișe individuale pentru fiecare animal.

**▼B**

Vor fi necesare observații suplimentare în cazul în care animalele manifestă în continuare semne de toxicitate. Observațiile vizează modificările pielii și blănii, ochilor și membranelor mucoaselor, modificările activității sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos central și vegetativ și ale activității somato-motorii și modificările de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremurăturii, convulsiilor, salivării, diareei, letargiei, somnului și comei. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în *Humane Endpoints Guidance Document* (9). Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

1.6.1. **Greutatea corporală**

Animalele se cântăresc individual puțin înainte de administrarea substanței de testat și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Se calculează și se înregistrează variațiile de greutate. La sfârșitul testului, animalele care au supraviețuit sunt cântărite și apoi eutanasiate.

1.6.2. **Patologie**

Toate animalele participante la test (inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din motive de bunăstare animală) sunt supuse unei autopsii macroscopice. Se înregistrează toate modificările patologice majore intervenite la fiecare animal. Se poate efectua, de asemenea, o examinare microscopică a organelor care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore, întrucât ar putea furniza informații utile.

2. **DATE**

Se furnizează date individuale despre animale. În plus, se face un rezumat tabelar al tuturor datelor, prezentând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

3. **RAPORT**

3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Substanța de testat:

— natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);

— date de identificare, inclusiv numărul CAS.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

Animalele de experiență:

— specie/sușă utilizată;

**▼B**

- starea microbiologică a animalelor, dacă se cunoaște;
- numărul, vârsta și sexul animalelor (inclusiv, dacă este cazul, o justificare pentru utilizarea de masculi în locul femelelor);
- sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;

## Condiții de testare:

- detalii privind prepararea substanței de testat, inclusiv detalii privind forma fizică a materialului administrat;
- detalii privind administrarea substanței de testat, inclusiv volumul dozelor și durata administrării;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa hranei, sursa apei);
- o justificare pentru selectarea dozei inițiale.

## Rezultate:

- un tabel cu datele privind reacția și nivelul dozei la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitate, natura, gravitatea și durata efectelor);
- un tabel cu greutatea corporală și variațiile acesteia;
- greutatea fiecărui animal în ziua administrării dozei, la intervale săptămânale ulterioare și în momentul morții sau al sacrificării;
- data și ora morții, dacă a survenit înainte de momentul planificat pentru sacrificare;
- graficul declanșării semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;
- concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

## Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86
2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.
3. Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610
4. Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.
5. Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC<sub>50</sub> Tests. ALTEX 16, 129-134
6. Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD<sub>50</sub> Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

**▼B**

7. Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
8. OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
9. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
10. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://web-net1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
11. Lipnick R L, Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I, Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995), Comparison of the Up-and Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
12. Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

*ANEXA 1***PROCEDURA DE URMAT PENTRU FIECARE DOZĂ INIȚIALĂ***OBSERVAȚII GENERALE*

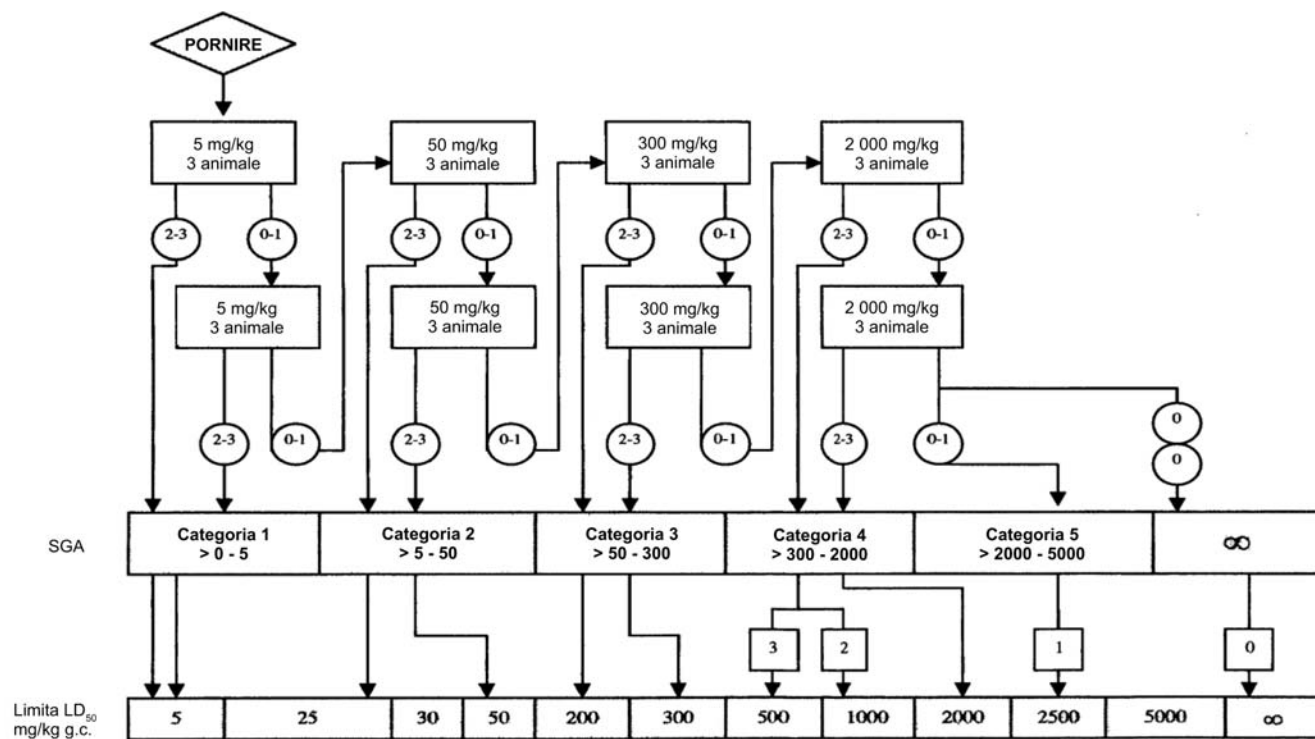
Pentru fiecare doză inițială, trebuie urmate diferitele scheme de testare, în conformitate cu cele prezentate în prezentul apendice.

- Apendicele 1a: doza inițială este de 5 mg/kg de greutate corporală
- Apendicele 1b: doza inițială este de 50 mg/kg de greutate corporală
- Apendicele 1c: doza inițială este de 300 mg/kg de greutate corporală
- Apendicele 1d: doza inițială este de 2 000 mg/kg de greutate corporală

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

APENDICELE 1A

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ ÎNIIĂLĂ DE 5 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



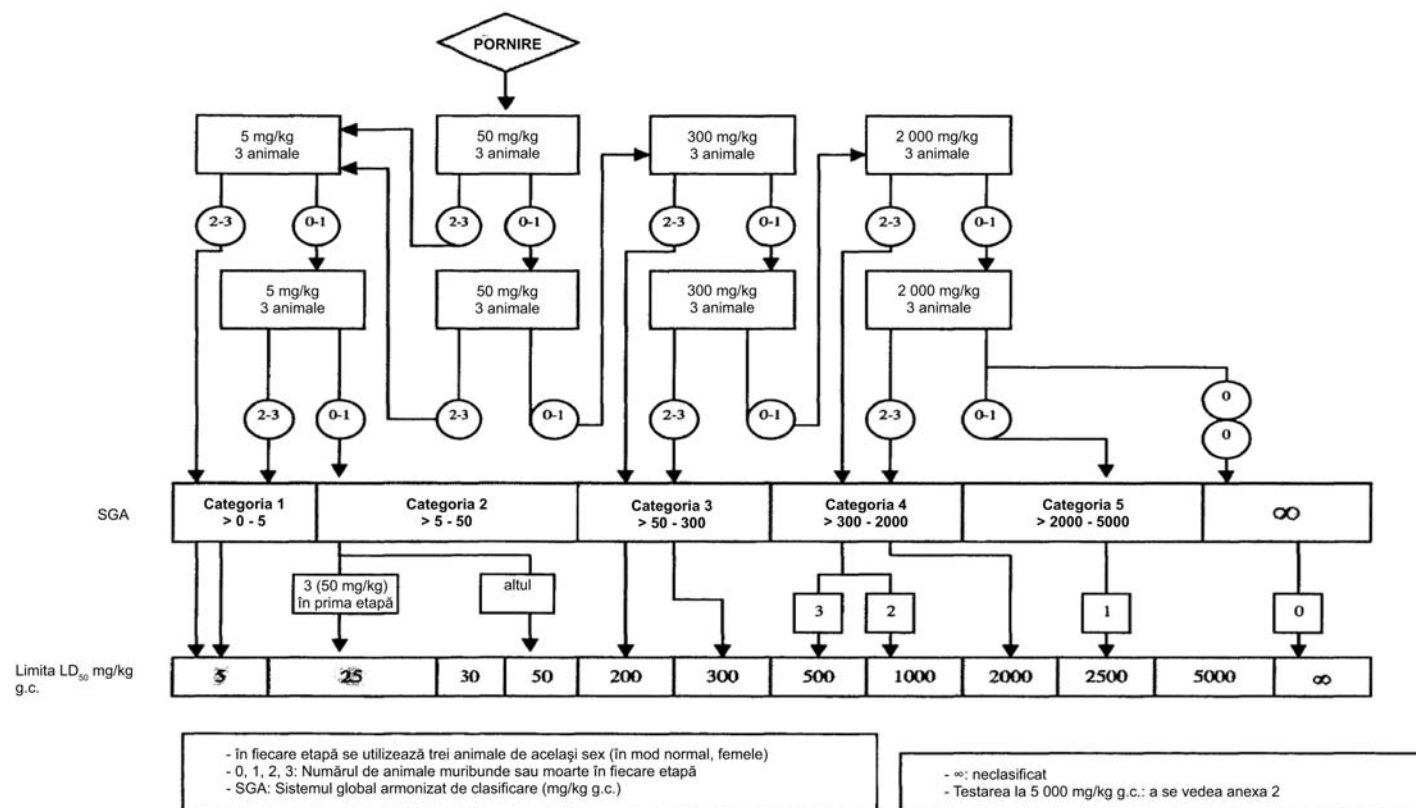
- în fiecare etapă se utilizează trei animale de același sex (în mod normal, femele)  
 - 0,1,2,3: Numărul de animale muribunde sau moarte în fiecare etapă  
 - SGA: Sistemul global armonizat de clasificare (mg / kg g.c.)

- ∞: neclasificat  
 - Testarea la 5 000 mg/kg g.c.: a se vedea anexa 2



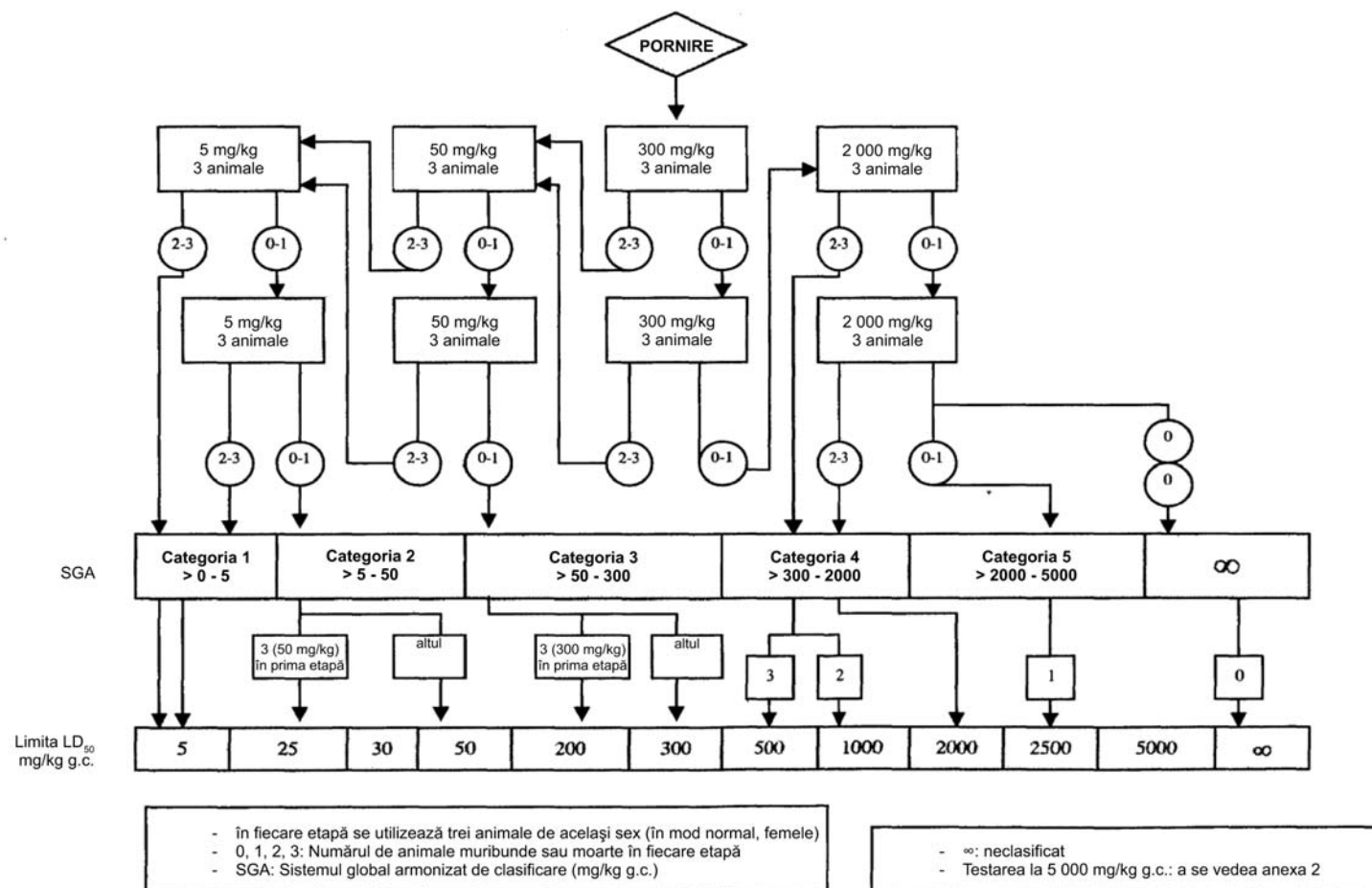
APENDICELE 1B

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ ÎNIIĂLĂ DE 50 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



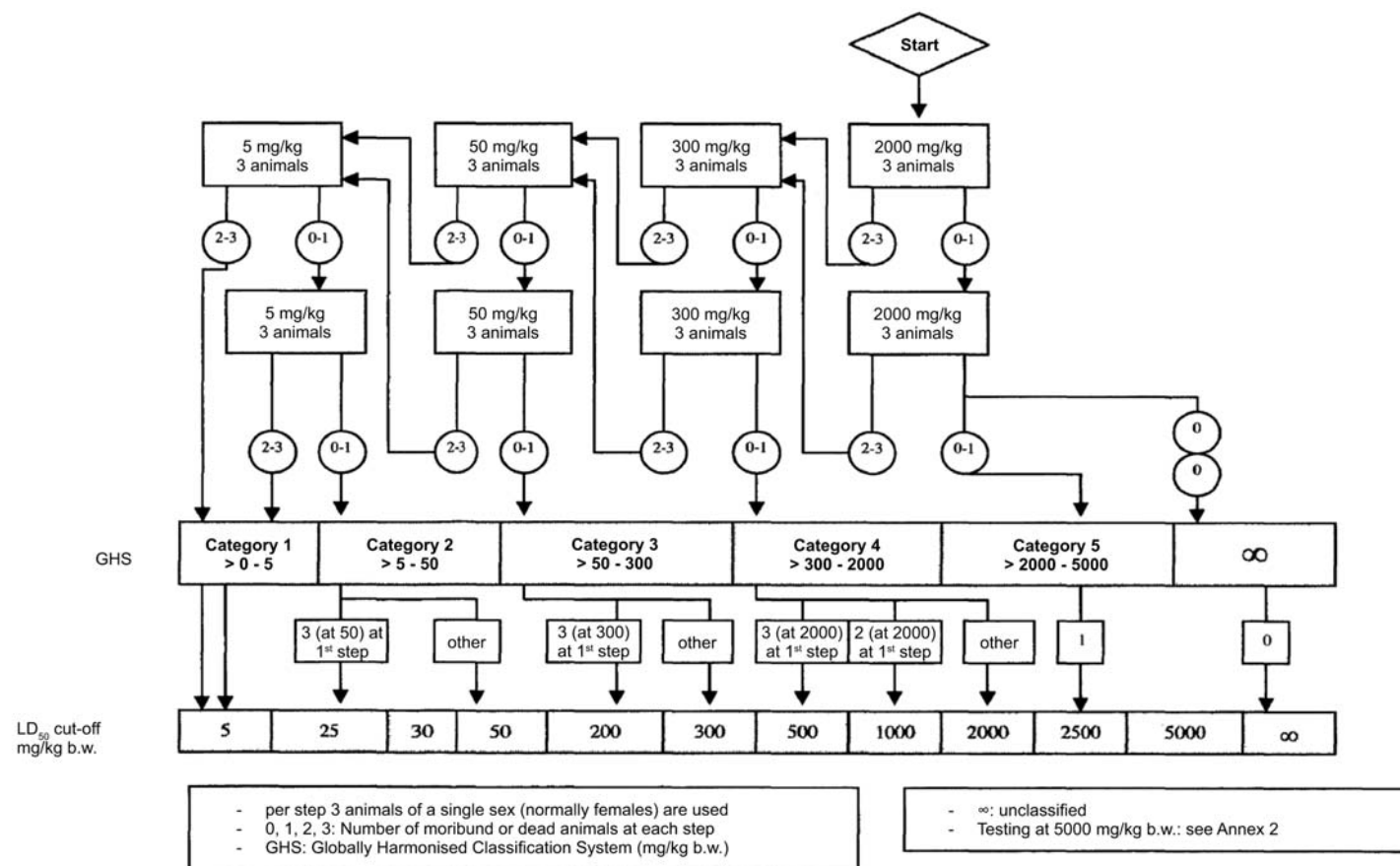
APENDICELE 1C

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ ÎNȚIALĂ DE 300 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



APENDICELE 1D

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ ÎNȚIALĂ DE 2 000 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ





## APENDICELE 2

### CRITERIILE PENTRU CLASIFICAREA SUBSTANȚELOR DE TESTAT CU VALORI ESTIMATE ALE LD<sub>50</sub> DE PESTE 2 000 MG/KG FĂRĂ A FI NECESARĂ TESTAREA

Criteriile pentru categoria de pericolozitate 5 au ca scop să permită identificarea substanțelor de testat care prezintă un pericol relativ scăzut de toxicitate acută dar care, în anumite circumstanțe, pot prezenta pericole pentru populațiile vulnerabile. Se anticipează că aceste substanțe au o LD<sub>50</sub> orală sau dermică între 2 000 și 5 000 mg/kg sau doze echivalente pentru alte căi. Substanța de testat se clasifică în categoria de pericolozitate definită prin: 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (categoria 5 din SGA) în următoarele cazuri:

- (a) dacă este încadrată în această categorie de oricare dintre diagramele de testare din anexele 1a-1d, pe baza incidenței deceselor;
- (b) dacă sunt deja disponibile date fiabile care arată că LD<sub>50</sub> se situează în limitele categoriei 5 sau alte studii pe animale sau privind efectele toxice asupra oamenilor indică o problemă acută pentru sănătatea oamenilor;
- (c) prin extrapolare, estimare sau măsurarea de date, dacă nu se justifică clasificarea într-o clasă de pericolozitate mai mare și
  - sunt disponibile informații fiabile privind efectele toxice semnificative asupra oamenilor; sau
  - se observă decese la testarea până la valorile din categoria 4 pe cale orală; sau
  - dacă concluziile unor experți confirmă semne clinice semnificative de toxicitate, la testarea până la valorile din categoria 4, cu excepția diareei, piloerecției sau a aspectului neîngrijit; sau
  - dacă concluziile experților confirmă informații fiabile care indică potențiale efecte acute semnificative conform altor studii asupra animalelor.

### TESTAREA CU DOZE PESTE 2 000 MG/KG

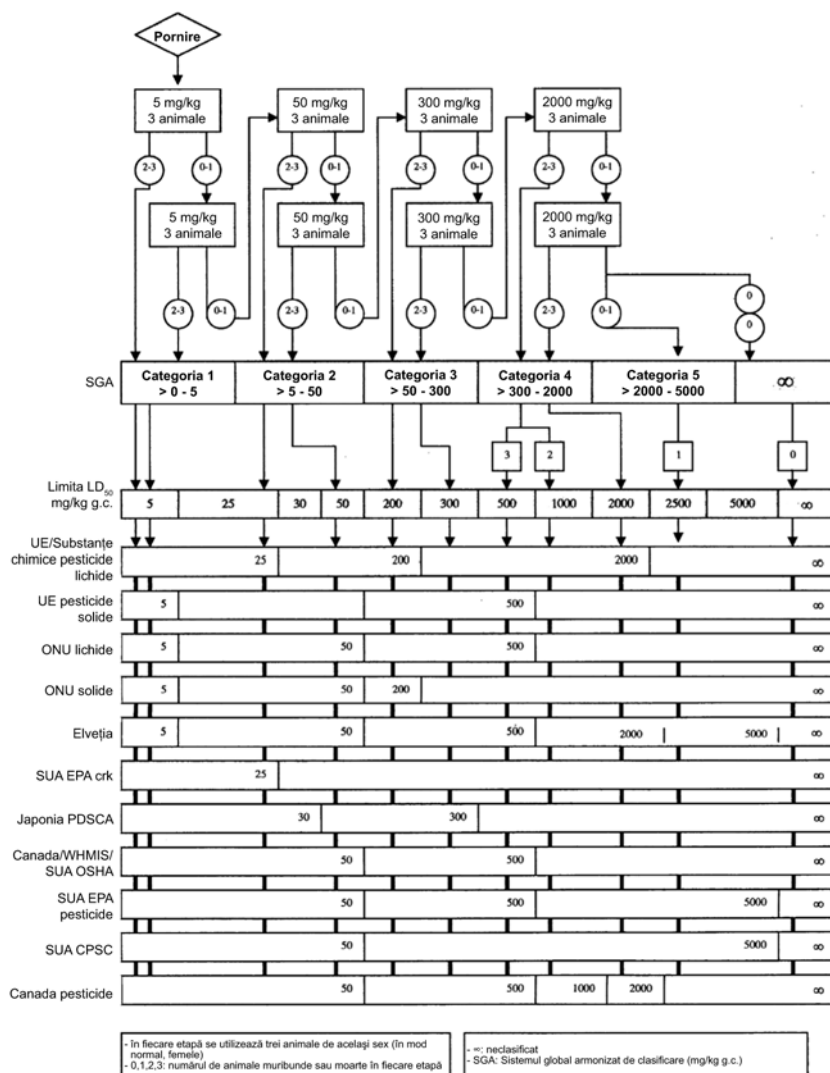
Recunoscând necesitatea de a proteja bunăstarea animală, testarea pe animale în limitele categoriei 5 (5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil că rezultatele acestor teste vor fi direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor și a sănătății animale (10). Nu se efectuează alte teste cu doze mai mari.

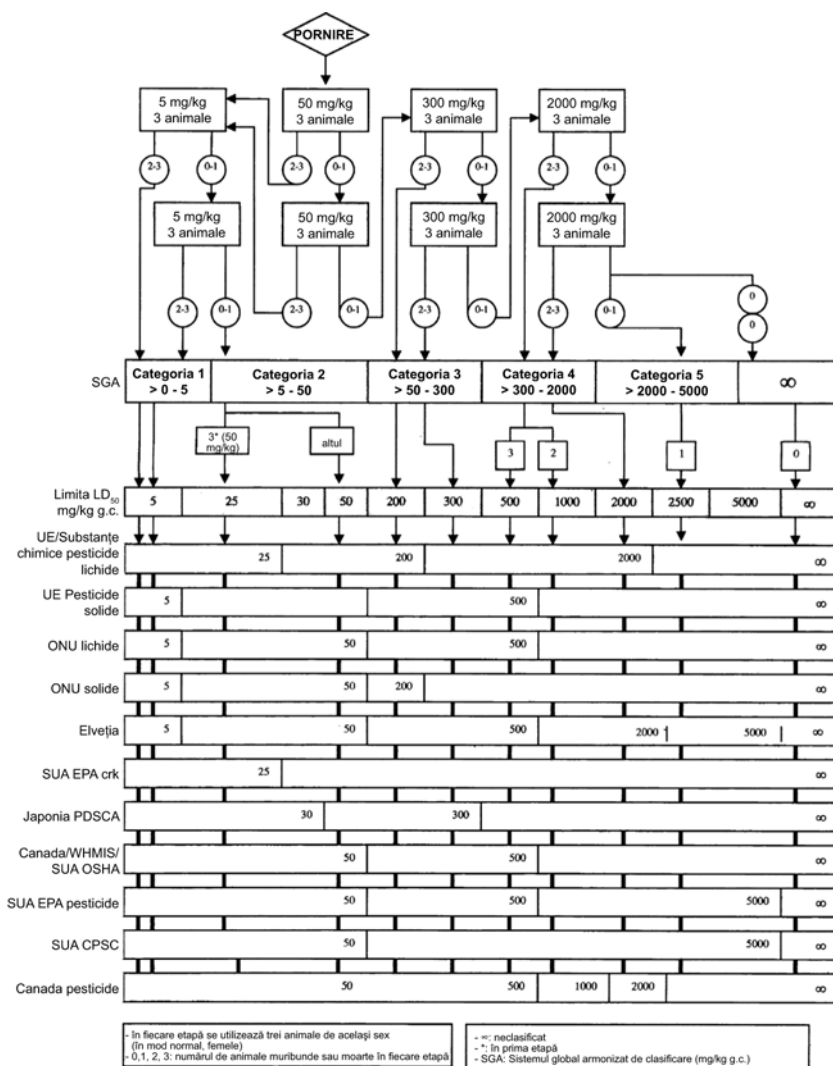
Când se impune testarea cu o doză de 5 000 mg/kg, este necesară o singură etapă (trei animale). Dacă primul animal tratat moare, testul continuă cu administrarea dozei de 2 000 mg/kg, în conformitate cu diagramele din appendicele 1. Dacă primul animal supraviețuiește, se administrează aceeași doză altor două animale. Dacă doar unul dintre cele trei animale moare, valoarea LD<sub>50</sub> este estimată la peste 5 000 mg/kg. Dacă mor două animale, se continuă procedura de administrare cu 2 000 mg/kg.



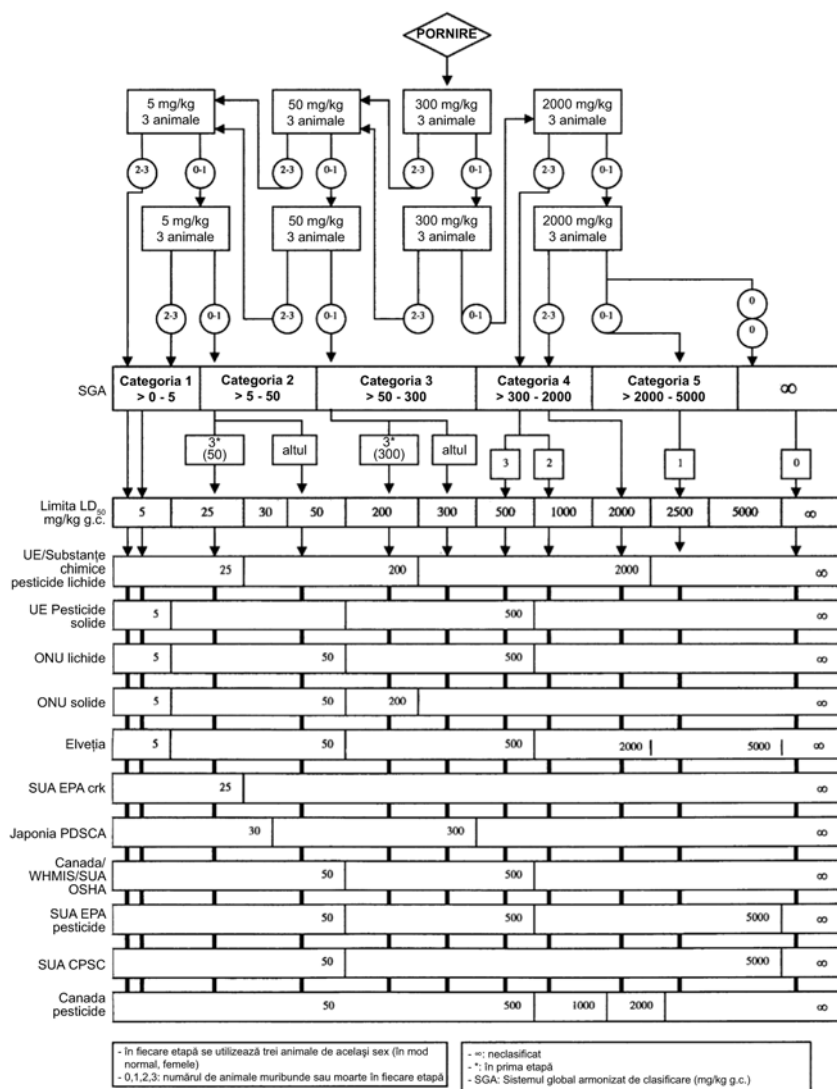
### APENDICELE 3

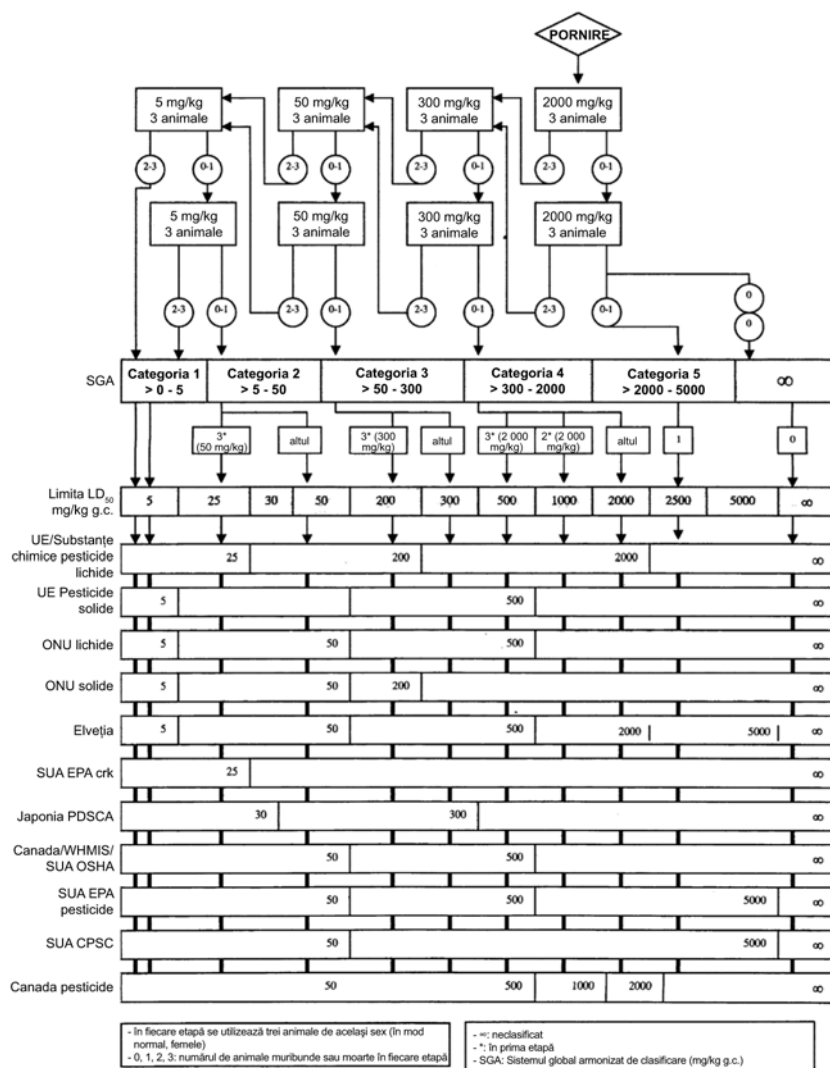
**METODA DE TESTARE B.1 tris** Indicații pentru clasificarea conform sistemului UE pentru perioada de tranziție până la punerea completă în aplicare a Sistemului global armonizat de clasificare (SGA) (preluate din referința 8)



▼ B

## ▼ B



▼ B



## ▼ M4

## B.2. TOXICITATEA ACUTĂ PRIN INHALARE

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 403 (2009) a OCDE (1). Versiunea originală a Orientării 403 privind testarea toxicității acute prin inhalare a fost adoptată în 1981. Această metodă de testare B.2 revizuită (ca echivalent al Orientării 403 revizuite) a fost concepută pentru a fi mai flexibilă, pentru reducerea gradului de utilizare a animalelor și pentru satisfacerea cerințelor de reglementare. Metoda de testare revizuită prezintă două tipuri de studii: un protocol tradițional  $LC_{50}$  și un protocol concentrație  $\times$  timp ( $C \times t$ ). Caracteristicile principale ale acestei metode de testare sunt capacitatea de a oferi o relație concentrație-răspuns de la rezultate non-letale la letale, pentru a obține concentrația letală medie ( $LC_{50}$ ), concentrația non-letală limită (de exemplu,  $LC_{01}$ ) și panta, precum și capacitatea de a identifica o posibilă susceptibilitate în funcție de sex. Protocolul  $C \times t$  trebuie să fie folosit în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică ce impune testarea pe animale pe mai multe perioade de timp, cum ar fi pentru planificarea reacției de urgență [de exemplu, determinarea nivelurilor orientative de expunere acută (AEGL), orientările privind planificarea reacției de urgență (ERPG) sau nivelurile-limită de expunere acută (AETL)] sau pentru planificarea folosirii terenurilor.
2. Orientări privind desfășurarea și interpretarea studiilor în legătură cu această metodă de testare se pot găsi în ghidul privind testarea toxicității acute prin inhalare (Ghidul 39) (2).
3. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la finele acestui capitol și în Ghidul 39 (2).
4. Această metodă de testare permite caracterizarea substanței chimice testate și evaluarea cantitativă a riscurilor și permite ordonarea și clasificarea substanțelor chimice testate în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (3). Ghidul 39 (2) prezintă orientări în alegerea metodei de testare corespunzătoare pentru testarea toxicității acute. În cazul în care sunt necesare doar informații privind clasificarea și etichetarea, se recomandă în general capitolul B.52 din prezenta anexă (4) [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Această metodă de testare B.2 nu este destinată în mod specific testării unor materiale specializate, cum ar fi compuși izometrici puțin solubili sau materiale fibroase sau nanomateriale artificiale.

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Înainte de a lua în considerare testarea în conformitate cu această metodă de testare, laboratorul care efectuează testele trebuie să țină seama de toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, inclusiv studiile existente [de exemplu, capitolul B.52 din prezenta anexă (4)] ale căror date ar susține neefectuarea unor testări suplimentare, pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate specii, sușe, sexe, moduri de expunere și concentrații de testare corespunzătoare includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizările anticipate și potențialul de expunere umană; datele (Q)SAR disponibile și datele toxicologice privind substanțele cu structură apropiată [a se vedea Ghidul 39 (2)].

## ▼ M4

6. Se evită, în măsura în care este posibil, testarea substanțelor chimice corozive și/sau iritante la concentrații despre care se anticipează că produc durere și/sau suferință gravă. Potențialul corosiv/iritant se evaluează pe baza experienței, folosind dovezi cum ar fi experiența la oameni și la animale (de exemplu, din studii cu doză repetată efectuate la concentrații necorozive/neiritante), date existente *in vitro* [de exemplu, din capitolele B.40, (5), B.40bis (6) din prezenta anexă sau din Orientarea 435 a OCDE (7)], valori ale pH-ului, informații privind substanțe similare sau orice date pertinente, pentru a investiga posibilitatea de a renunța la alte testări. Pentru cerințe de reglementare specifice (de exemplu, pentru planificare în situații de urgență), această metodă de testare se poate folosi pentru expunerea animalelor la aceste materiale, deoarece permite conducătorului studiului sau investigatorului principal să dețină controlul asupra alegerii concentrațiilor țintă. Cu toate acestea, concentrațiile vizate nu trebuie să inducă efecte iritante/corozive grave, dar trebuie să fie suficient de mari pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt alese în mod individualizat și se prezintă justificarea pentru alegerea concentrației [a se vedea Ghidul 39 (2)].

## PRINCIPIUL TESTULUI

7. Această metodă de testare revizuită B.2 a fost concepută în vederea obținerii de informații suficiente privind toxicitatea acută a unei substanțe chimice testate pentru a permite clasificarea sa și pentru a furniza date privind caracterul letal (de exemplu,  $LC_{50}$ ,  $LC_{01}$  și panta) pentru unul sau ambele sexe, așa cum este necesar pentru evaluările cantitative ale riscului. Această metodă de testare oferă două metode. Prima metodă este un protocol tradițional în care grupuri de animale sunt expuse unei concentrații-limită (test la valori-limită) sau unei serii de concentrații în cadrul unei proceduri secvențiale, pe o durată predeterminată, de obicei de 4 ore. Alte durate de expunere se pot aplica pentru scopuri de reglementare specifice. A doua metodă este un protocol de tip ( $C \times t$ ), în cadrul căruia grupuri de animale sunt expuse unei concentrații (limită) sau unei serii de concentrații multiple pentru durate multiple.
8. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul Ghidului OCDE nr. 19 privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (8).

## DESCRIEREA METODEI

**Selectarea speciilor de animale**

9. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușe folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul, iar în cazul în care se utilizează alte specii alegerea trebuie să fie justificată.

**Pregătirea animalelor**

10. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua expunerii, animalele trebuie să fie adulți tineri în vârstă de 8 până la 12 săptămâni, iar greutatea lor corporală trebuie să fie în limita  $\pm 20\%$  din greutatea medie pentru fiecare sex a tuturor animalelor expuse anterior, de aceeași vârstă. Animalele sunt selectate aleatoriu și marcate pentru identificare individuală. Animalele se țin în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator. De asemenea, animalele trebuie să fie aclimatizate la aparatul de testare pentru o scurtă perioadă înainte de testare, deoarece astfel se va reduce stresul produs prin introducerea în noul mediu.

▼ **M4****Îngrijirea animalelor**

11. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă trebuie să fie menținută, în mod ideal, în intervalul 30 până la 70 %, deși acest lucru poate să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri, animalele sunt închise în cuști în grupuri, în funcție de sex și de concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele urmează să fie expuse doar în zona nasului, ar putea fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau de imobilizare. Imobilizarea poate influența efecte fiziologice cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator. În cazul în care sunt disponibile date generice care demonstrează că nu se produc asemenea modificări într-o măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea preliminară la tuburile de imobilizare. Animalele la care întregul corp este expus unui aerosol sunt ținute în cuști individuale în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare de laborator, convenționale și certificate, cu excepția perioadei de expunere, împreună cu o cantitate nelimitată de apă potabilă din rețeaua municipală. Iluminatul este artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

**Incinte de inhalare**

12. La selectarea unei incinte de inhalare se iau în considerare natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). Expunerea doar în zona nasului este preferată, în general, pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere a întregului corp, dar această metodă trebuie să fie justificată în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, volumul total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și expunere a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor specifice sunt descrise în Ghidul 39 (2).

**CONDIȚII DE EXPUNERE****Administrarea concentrațiilor**

13. La șobolani, expunerile doar în zona nasului pot avea orice durată până la 6 ore. În cazul în care șoarecii sunt expuși doar în zona nasului, expunerile nu trebuie să depășească, în general, 4 ore. În cazul în care sunt necesare studii pe durată mai mare, trebuie să se prezinte o justificare [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Animalele expuse la aerosoli în incinte destinate expunerii întregului corp sunt ținute în cuști separate, pentru a preveni ingestia substanței testate prin îngrijirea corporală a altor animale din cușcă. Hrănirea se sistează pe durata expunerii. În timpul expunerii prin intermediul întregului corp se poate asigura apa.
14. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosol sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, concentrația aleasă și/sau forma fizică cea mai probabilă în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele chimice higroscopice și reactive din punct de vedere chimic se testează în condiții de aer uscat. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita generarea de concentrații explozive.

▼ **M4****Distribuția granulometrică**

15. Determinarea granulometriei se efectuează pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) între 1 și 4  $\mu\text{m}$ , cu o abatere standard geometrică ( $\sigma_g$ ) în intervalul 1,5-3,0 (2) (9) (10). Deși trebuie să se depună un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, în cazul în care acest lucru nu este posibil trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, vaporii de metale pot fi sub acest standard iar particulele cu sarcină electrică, fibrele și materialele higroscopice (a căror dimensiune crește în mediul umed din căile respiratorii) pot depăși acest standard.

**Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul**

16. Se poate folosi un vehicul pentru a genera valori adecvate ale concentrației substanței chimice testate în atmosferă și ale granulometriei. Ca regulă, se preferă apa. Particulele în suspensie pot fi supuse unor procese mecanice pentru a atinge granulometria necesară, dar se iau măsuri pentru a evita descompunerea sau alterarea substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au alterat compoziția chimică a substanței chimice testate (de exemplu, temperaturi extreme datorate frecării în timpul măcinării excesive), se verifică analitic compoziția substanței chimice testate. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita contaminarea substanței chimice testate. Nu este necesară testarea materialelor granulare nefriabile care sunt formulate pentru a nu fi inhalabile. Se folosește un test de atriție pentru a demonstra că nu se produc particule respirabile la manipularea materialului granular. În cazul în care testul de atriție conduce la formarea de substanțe respirabile, se efectuează un test de toxicitate prin inhalare.

**Animale din grupul martor**

17. Nu este necesar un grup martor negativ (aer) studiat în paralel. Atunci când se folosește un alt vehicul decât apa pentru generarea atmosferei de testare, se folosește un grup martor pentru vehicul doar dacă nu sunt disponibile date istorice privind toxicitatea prin inhalare. În cazul în care un studiu de toxicitate a unei substanțe chimice de testare formulate într-un vehicul nu indică nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată; astfel încât nu este necesar un vehicul martor.

**MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE****Debitul de aer în incintă**

18. Debitul de aer prin cameră trebuie să fie controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea concentrației (sau stabilității) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de control al parametrilor relevanți pentru generarea atmosferei dinamice. Trebuie să se acorde o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte destinate expunerii doar în zona nasului, în cazurile în care debitul de aer prin sistemul de expunere este inadecvat pentru a asigura un flux dinamic al atmosferei ce conține substanța chimică testată. Există metodologii recomandate care se pot folosi pentru a demonstra că nu se produce reinhalarea în condițiile de lucru alese (2) (11). Concentrația de oxigen trebuie să fie de minimum 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se pot atinge aceste standarde, se măsoară concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon.

▼ **M4****Temperatura și umiditatea relativă în incintă**

19. Temperatura incintei se menține la  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă în zona în care respiră animalele, atât la expunerea în zona nasului, cât și a întregului corp, se monitorizează și se înregistrează de cel puțin trei ori pentru durate de până la 4 ore și orar, pentru durate mai scurte. În mod ideal, umiditatea relativă trebuie să fie menținută în intervalul 30-70 % dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

**Substanța chimică testată: concentrația nominală**

20. Când este posibil, se calculează și se înregistrează concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală este masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este folosită pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

**Substanța chimică testată: concentrația efectivă**

21. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie să fie susținută prin caracterizările specifice ale substanței chimice testate din studii preliminare. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponente se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în acest caz, sunt necesare date analitice care demonstrează similaritatea între compoziția materialului în suspensie în aer și cea a materialului inițial. În cazul în care aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară reanalizarea substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer) la intervale regulate, pe parcursul studiului. Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă. Concentrațiile-țintă nominale și efective se prezintă în raportul de studiu, dar numai concentrațiile efective se folosesc în analizele statistice pentru a calcula valorile concentrației letale.
22. Se folosește un lot de substanță chimică testată, dacă este posibil, iar proba testată se păstrează în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței testate, inclusiv puritatea sa și, dacă este realizabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără a se limita la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară rezultată în urma analizelor de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei de testare nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu, culoare, natura fizică etc.).
23. Atmosfera de expunere se menține cât mai constantă posibil și se monitorizează continuu și/sau intermitent, în funcție de metoda de analiză. Atunci când se folosește prelevarea intermitentă, probele de atmosferă din incintă se prelevează cel puțin de două ori în cadrul unui studiu de patru ore. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. Dacă apar fluctuații accentuate de la o probă la alta, la următoarele concentrații testate se utilizează patru probe pentru fiecare expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu

▼ **M4**

trebuie să se abată de la concentrația medie cu mai mult de  $\pm 10\%$  pentru gaze și vapori sau  $\pm 20\%$  pentru aerosolii cu lichide sau solide. Se calculează și se consemnează timpul necesar pentru echilibrarea incintei ( $t_{95}$ ). Durata unei expuneri acoperă timpul în care este generată substanța chimică testată și aceasta ia în considerare perioadele necesare pentru a se atinge  $t_{95}$ . Orientări privind estimarea  $t_{95}$  pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

24. Pentru amestecuri foarte complexe, constând în gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice de testare propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), este posibil ca fiecare fază să se comporte diferit într-o incintă de inhalare, astfel încât trebuie să se selecteze cel puțin o substanță indicatoare (analit), în mod normal substanța activă principală din amestec, pentru fiecare fază (gaz/vapori și aerosoli). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, se consemnează concentrația analitică pentru amestec și nu doar pentru substanța activă sau componentul activ (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

**Substanța chimică testată: distribuția granulometrică**

25. Distribuția granulometrică a aerosolilor se determină cel puțin de două ori în timpul fiecărei expuneri de 4 ore, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de determinare a granulometriei. În cazul în care se obțin rezultate echivalente cu impactorul în cascadă și cu un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/barbotor de gaze, se folosește în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometriei trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, se iau măsuri de minimizare a datelor neconcludente, care pot duce la necesitatea de a repeta o expunere. Determinarea granulometriei se face pentru vapori dacă există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule într-o atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte (a se vedea punctul 15).

**PROCEDURĂ**

26. În continuare sunt descrise două tipuri de studii: protocolul tradițional și protocolul  $C \times t$ . Ambele protocoale pot include un studiu de observare, un studiu principal și/sau un test la valori-limită (protocolul tradițional) sau testarea la o concentrație-limită ( $C \times t$ ). Atunci când se știe că un sex este mai receptiv, conducătorul studiului poate alege să efectueze studiile folosind doar sexul receptiv. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. Înainte de a începe, se iau în considerare toate datele disponibile, pentru a minimiza utilizarea animalelor. De exemplu, datele generate folosind capitolul B.52 din prezenta anexă (4) pot elimina necesitatea unui studiu de observare și, de asemenea, pot demonstra dacă un sex este mai receptiv [a se vedea Ghidul 39 (2)].

▼ **M4****PROTOCOLUL TRADIȚIONAL****Considerații generale: protocolul tradițional**

27. În cadrul unui studiu tradițional, grupurile de animale sunt expuse la o substanță chimică de testare pentru o perioadă fixă (în general, 4 ore) într-o încălț de expunere în zona nasului sau a întregului corp. Animalele sunt expuse la o concentrație-limită (test la valori-limită) sau la minimum trei concentrații într-o procedură secvențială (studiu principal). Studiul principal poate fi precedat de un studiu de observare, în afara cazului în care există deja unele informații privind substanța chimică testată, de exemplu un studiu B.52 anterior [a se vedea Ghidul 39 (2)].

**Studiul de observare: protocolul tradițional**

28. Un studiu de observare se folosește pentru a estima tăria substanței chimice testate, pentru a indica diferențe de receptivitate între sexe și pentru a ajuta la selectarea nivelurilor de concentrație de expunere pentru studiul principal sau testul la valori-limită. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de observare, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv date (Q)SAR și date pentru substanțe chimice similare. Nu se vor expune mai mult de trei masculi și trei femele la fiecare concentrație (pot fi necesare 3 animale/sex, pentru a stabili o diferență între sexe). Un studiu de observare poate consta într-o singură concentrație, dar se pot testa mai multe concentrații, dacă este necesar. Un studiu de observare nu trebuie să implice la fel de multe animale și concentrații ca în cazul unui studiu principal. În schimb, se poate folosi un studiu B.52 efectuat anterior (4) în locul unui studiu de observare [a se vedea Ghidul 39 (2)].

**Testul la valori-limită: protocolul tradițional**

29. Se folosește un test la valori-limită atunci când substanța chimică testată este cunoscută sau anticipată ca fiind practic netoxică, adică generând un răspuns toxic doar peste limita de concentrație reglementată. În cadrul unui test la valori-limită, un singur grup de trei masculi și trei femele este expus la substanța chimică testată la o concentrație-limită. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate pot fi deduse din cunoștințele despre substanțe testate similare, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea sau atunci când se estimează că substanța testată este toxică, se efectuează testul principal.
30. De obicei, selectarea concentrațiilor-limită depinde de cerințele de reglementare. În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l (sau concentrația maximă realizabilă) (3). Din punct de vedere tehnic, poate fi dificilă generarea concentrațiilor-limită la unele substanțe chimice testate, în special la cele sub formă de vapori sau aerosoli. La testarea aerosolilor, obiectivul principal este atingerea unei dimensiuni respirabile a particulelor (DAMM de 1-4 μm). Acest lucru este posibil pentru majoritatea substanțelor chimice testate la o concentrație de 2 mg/l. Testarea aerosolilor la o concentrație mai mare de 2 mg/l este încercată doar în cazul în care se poate atinge o dimensiune respirabilă a particulelor [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 descurajează testarea peste concentrația-limită, din motive care țin de bunăstarea animalelor (3). Concentrația-limită este luată în considerare doar atunci când există o probabilitate mare ca rezultatele unui asemenea test să aibă relevanță directă pentru protejarea sănătății umane (3) și când justificarea este prezentată în raportul de studiu. În cazul unor substanțe de testare potențial explozive, trebuie să se ia măsuri pentru a evita condițiile favorabile unei explozii. Pentru a evita o utilizare inutilă a animalelor, se efectuează un rând de teste fără animale înainte de testul la valori-limită, pentru a asigura că în încălț se pot atinge condițiile necesare pentru un test la valori-limită.



## ▼ M4

31. În cazul în care se observă cazuri de deces sau agonie la concentrația-limită, rezultatele testului la valori-limită pot servi ca studiu de observare pentru testarea ulterioară la alte concentrații (a se vedea studiul principal). Atunci când proprietățile fizice sau chimice ale unei substanțe chimice testate fac imposibilă atingerea unei concentrații limită, se testează concentrația maximă realizabilă. În cazul în care se atinge o mortalitate sub 50 % la concentrația maximă realizabilă, nu este necesară testarea suplimentară. Atunci când nu se poate atinge concentrația-limită, raportul de studiu trebuie să prezinte o explicație și date doveditoare. În cazul în care concentrația maximă realizabilă a unor vapori nu conduce la toxicitate, poate fi necesar ca substanța chimică testată să fie generată ca aerosol lichid.

**Studiul principal: protocolul tradițional**

32. De obicei, un studiu principal este efectuat cu cinci masculi și cinci femele (sau cinci animale din sexul receptiv, dacă acesta este cunoscut) pentru fiecare nivel de concentrație, cu cel puțin trei niveluri de concentrație. Pentru a obține o analiză statistică credibilă, trebuie să se folosească suficiente niveluri de concentrație. Intervalul de timp dintre grupurile de expunere se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există un nivel rezonabil de încredere privind supraviețuirea animalelor testate anterior. Acest lucru permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația-țintă pentru următorul grup de expunere. Din cauza dependenței de tehnologii complexe, această metodă poate să nu fie întotdeauna practică în studiile de inhalare, astfel încât expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație trebuie să se bazeze pe experiența anterioară și pe judecata științifică. La testarea amestecurilor trebuie consultat Ghidul 39 (2).

**PROTOCOLUL CONCENTRAȚIE × TIMP ( $C \times T$ )****Considerații generale: protocolul  $C \times t$** 

33. Un studiu secvențial după protocolul  $C \times t$  poate fi luat în considerare ca alternativă la protocolul tradițional pentru evaluarea toxicității prin inhalare (12) (13) (14). Această abordare permite expunerea animalelor la o substanță chimică testată la mai multe niveluri de concentrație și pentru durate multiple. Întreaga testare este efectuată într-o incintă pentru expunere doar în zona nasului (incintele pentru întregul corp nu sunt practice pentru acest protocol). O diagramă din apendicele 1 ilustrează acest protocol. O analiză de simulare a arătat că atât protocolul tradițional cât și protocolul  $C \times t$  pot conduce la valori  $LC_{50}$  de încredere, dar protocolul  $C \times t$  este, în general, mai potrivit pentru obținerea unor valori de încredere pentru  $LC_{01}$  și  $LC_{10}$  (15).
34. O analiză de simulare a demonstrat că folosirea a două animale pentru fiecare interval  $C \times t$  (unul din fiecare sex, atunci când se folosesc ambele sexe, sau două din sexul mai receptiv) poate fi, în general, adecvată pentru testarea a 4 concentrații și 5 durate de expunere într-un studiu principal. În anumite circumstanțe, conducătorul studiului poate alege să folosească doi șobolani din fiecare sex, pentru fiecare interval  $C \times t$  (15). Utilizarea a 2 animale din fiecare sex și pentru fiecare punct de concentrație/timp poate reduce dezechilibrul și variabilitatea estimărilor, poate crește rata de succes a estimării și îmbunătățește acoperirea intervalului de încredere. Cu toate acestea, în cazul unei corespondențe insuficient de strânse cu datele pentru estimare (la utilizarea unui animal din fiecare sex sau a două animale din sexul mai receptiv) poate fi suficientă a cincea concentrație de expunere. Orientări suplimentare privind numărul de animale și concentrațiile care trebuie folosite într-un studiu  $C \times t$  se pot găsi în Ghidul 39 (2).



▼ **M4****Studiul de observare: protocolul C × t**

35. Un studiu de observare se folosește pentru a estima tăria substanței chimice testate și a ajuta la selectarea nivelurilor de concentrație de expunere pentru studiul principal. Un studiu de observare cu până la trei animale/sex/concentrație [pentru detalii, a se vedea appendicele III la Ghidul 39 (2)] poate fi necesar pentru a alege o concentrație de pornire adecvată pentru studiul principal și pentru a minimiza numărul de animale utilizate. Pentru a stabili o diferență între sexe, poate fi necesar să se folosească trei animale din fiecare sex. Aceste animale sunt expuse pe parcursul unei singure durate, în general 240 de minute. Posibilitatea de a genera atmosfere de testare corespunzătoare se evaluează în cursul testelor preliminare fără animale. În general, nu este necesar un studiu de observare dacă sunt disponibile date privind mortalitatea dintr-un studiu B.52 (4). La alegerea concentrației-întă inițiale într-un studiu B.2, conducătorul studiului trebuie să ia în considerare modelele de mortalitate observate în orice studiu B.52 disponibil (4) pentru ambele sexe și pentru toate concentrațiile testate [a se vedea Ghidul 39 (2)].

**Concentrație inițială: protocolul C × t**

36. Concentrația inițială (sesiunea de expunere I) (appendicele 1) va fi o concentrație-limită sau o concentrație aleasă de conducătorul studiului pe baza studiului de observare. Grupuri de 1 animal/sex sunt expuse la această concentrație pe durate multiple (de exemplu, 15, 30, 60, 120 sau 240 de minute), rezultând un număr total de 10 animale (sesiunea de expunere I) (appendicele 1).
37. De obicei, selectarea concentrațiilor-limită depinde de cerințele de reglementare. În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l (sau concentrația maximă realizabilă) (3). Din punct de vedere tehnic, poate fi dificil să se genereze concentrații-limită la unele substanțe chimice testate, în special sub formă de vapori sau aerosoli. La testarea aerosolilor, obiectivul este atingerea unei dimensiuni respirabile a particulelor (adică DAMM de 1-4 μm) la o concentrație-limită de 2 mg/l. Acest lucru este posibil cu majoritatea substanțelor chimice testate. Testarea aerosolilor la o concentrație peste 2 mg/l trebuie încercată doar dacă se poate atinge o dimensiune respirabilă a particulelor [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 descurajează testarea peste o limită de concentrație, din motive de bunăstare a animalelor (3). Testarea peste concentrația-limită este luată în considerare atunci când există o probabilitate mare ca rezultatele unui asemenea test să aibă relevanță directă pentru protejarea sănătății umane (3) și trebuie să se prezintă justificarea în raportul de studiu. În cazul unor substanțe chimice testate potențial explozive, trebuie să se ia măsuri pentru a evita condiții favorabile unei explozii. Pentru a evita o utilizare inutilă a animalelor, se efectuează un rând de teste fără animale înainte de testarea la concentrația inițială, pentru a asigura că în incintă se pot atinge condițiile necesare pentru această concentrație.
38. În cazul în care se observă cazuri de deces sau agonie la concentrația inițială, rezultatele pentru această concentrație pot servi ca punct de plecare pentru testarea ulterioară la alte concentrații (a se vedea studiul principal). În cazul în care când proprietățile fizice sau chimice ale unei substanțe chimice testate fac imposibilă atingerea unei concentrații-limită, se testează concentrația maximă realizabilă. Atunci când mortalitatea obținută la concentrația maximă realizabilă este sub 50 %, nu este necesară testarea suplimentară. Dacă nu se poate atinge concentrația-limită, raportul de studiu trebuie să prezinte o explicație și date doveditoare. În cazul în care concentrația maximă realizabilă a unor vapori nu duce la toxicitate, poate fi necesar ca substanța chimică testată să fie generată ca aerosol lichid.

▼ **M4****Studiul principal: protocolul  $C \times t$** 

39. Concentrația inițială (sesiunea de expunere I) (apendicele 1) testată în cadrul studiului principal va fi o concentrație-limită sau o concentrație aleasă de conducătorul studiului pe baza studiului de observare. În cazul în care s-au observat cazuri de mortalitate în timpul sau după sesiunea de expunere I, expunerea minimă ( $C \times t$ ) care duce la mortalitate va fi luată ca indicație pentru a stabili concentrația și perioadele de expunere pentru sesiunea de expunere II. Fiecare sesiune de expunere ulterioară va depinde de sesiunea anterioară (a se vedea apendicele 1).
40. Pentru numeroase substanțe chimice testate, rezultatele obținute la concentrația inițială, împreună cu trei ședințe de expunere suplimentare cu o grilă de timp mai mică (adică distanțarea geometrică a perioadelor de expunere așa cum indică factorul dintre perioadele succesive, în general  $\sqrt{2}$ ), vor fi suficiente pentru a stabili relația între  $C \times t$  și mortalitate (15), dar poate fi benefică folosirea unei a cincea concentrații de expunere [a se vedea apendicele 1 și Ghidul 39 (2)]. Pentru interpretarea matematică a rezultatelor pentru protocolul  $C \times t$ , a se vedea apendicele 1.

**OBSERVAȚII**

41. Animalele sunt observate clinic frecvent în timpul perioadei de expunere. După expunere, observațiile clinice se fac cel puțin de două ori în ziua expunerii sau mai frecvent dacă răspunsul animalelor la tratament indică acest lucru și cel puțin o dată pe zi după aceea, timp de 14 zile în total. Lungimea perioadei de observație nu este fixă, ci este determinată de natura și momentul de instalare a semnelor clinice și de lungimea perioadei de recuperare. Momentele de apariție și dispariție a semnelor de toxicitate sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere. Toate observațiile se consemnează sistematic, ținându-se evidențe separate pentru fiecare animal. Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate, din considerente care țin de bunăstarea animalelor. Examinările pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate trebuie să fie efectuate cu atenție, pentru ca un aspect inițial defavorabil și modificările respiratorii tranzitorii, rezultate în urma procedurii de expunere, să nu fie confundate cu toxicitatea substanței chimice testate, care ar impune eutanasierea prematură a animalelor. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în ghidul privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (Ghidul 19) (7). În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.
42. Observațiile asupra animalelor în cușcă trebuie să includă modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor, activitatea sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos autonom și central, precum și activitatea somato-motorie și modelele de comportament. Acolo unde este posibil, se vor consemna orice diferențe între efectele locale și cele sistemice. Se va acorda o atenție specială observării tremurăturii, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi de bradipnee reflexă sau hipo/hipertermie asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate.

**Greutatea corporală**

43. Greutățile individuale ale animalelor sunt consemnate o dată după perioada de aclimatizare, în ziua expunerii, înainte de expunere (ziua 0) și cel puțin în zilele 1, 3 și 7 (și săptămânal după aceea), precum și la momentul morții sau eutanasierii, dacă acestea survin după ziua 1. Greutatea corporală este recunoscută ca un indicator critic al toxicității, astfel încât animalele care prezintă o reducere susținută a greutății,  $\geq 20\%$ , comparativ cu valorile dinainte de studiu, sunt monitorizate îndeaproape. La finalul perioadei de după expunere, animalele supraviețuitoare sunt cântărite și eutanasiate.

**▼ M4****Patologia**

44. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animală, sunt supuse unei autopsii. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce este descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficiente de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se fac imediat ce este posibil, în mod normal după o zi sau două. Toate modificările patologice macroscopice sunt consemnate pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.
45. Pot fi luate în considerare examinări suplimentare incluse *a priori* în protocol, pentru extinderea valorii interpretative a studiului, de exemplu măsurarea masei pulmonare a șobolanilor supraviețuitori și/sau prezentarea unor semne de iritație, prin examinarea microscopică a căilor respiratorii. Organele examinate pot include, de asemenea, pe cele care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore și organele despre care se știe sau se anticipează că vor fi afectate. Examinarea microscopică în întregime a căilor respiratorii poate furniza informații utile privind substanțele chimice testate care reacționează cu apa, de exemplu acizii și substanțele higroscopice.

**DATE ȘI RAPORT****Date**

46. Pentru greutatea corporală și rezultatele autopsiei la animale se furnizează date individuale. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, prezentând, pentru fiecare grup testat, numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

**Raportul de testare**

47. Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

*Animale testate și îngrijirea lor*

- descrierea condițiilor de ținere în cuști, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de expunere la lumină și identificarea regimului alimentar;
- specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea unei alte specii decât șobolanul;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- metodele de randomizare;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);
- descrierea oricăror condiții dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli;

**▼ M4***Substanța chimică testată*

- natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);
- date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut;

*Vehiculul*

- justificarea utilizării vehiculului și justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);
- date istorice sau concurente care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului;

*Incinta de inhalare*

- descrierea incintei de inhalare, inclusiv dimensiunile și volumul;
- sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și generarea atmosferei;
- echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, granulometriei și concentrației efective;
- sursa de aer și tratarea aerului alimentat/extras și sistemul folosit pentru condiționare;
- metodele folosite pentru calibrarea echipamentului în vederea asigurării unei atmosfere de testare omogenă;
- diferența de presiune (pozitivă și negativă);
- orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);
- omogenitatea/stabilitatea în timp a atmosferei de testare;
- amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;
- debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (pentru expunerea întregului corp);
- informațiile privind echipamentul folosit pentru măsurarea oxigenului și dioxidului de carbon, dacă este cazul;
- timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare ( $t_{95}$ );
- numărul modificărilor volumetrice pe oră;
- dispozitive de măsurare (după caz);

*Datele privind expunerea*

- justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;
- concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);
- concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli); fiecare poate fi analizată separat;

**▼ M4**

- toate concentrațiile în aer sunt consemnate în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m<sup>3</sup> etc.); pot fi consemnate în paranteze și unități de volum (de exemplu, ppm, ppb etc.);
- distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică ( $\sigma$ ), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Trebuie să se consemneze analizele granulometrice individuale.

*Condițiile de testare*

- detaliile privind prepararea substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor de materiale solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate. În cazurile în care este posibil ca procesele mecanice să fi alterat compoziția substanței chimice testate, se includ rezultatele analizelor pentru verificarea compoziției substanței chimice testate;
- o descriere (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;
- detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);
- justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare;

*Rezultate*

- prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;
- prezentarea sub formă tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;
- prezentarea sub formă tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și  $\sigma_g$ ;
- prezentarea sub formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea, momentul instalării și durata efectelor);
- greutatea individuale ale animalelor, măsurate în cadrul studiului; data și ora morții, dacă au avut loc înainte de eutanasiere, momentul instalării semnelor de toxicitate și dacă acestea au fost reversibile pentru fiecare animal;
- concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;
- estimări privind mortalitatea (de exemplu, LC<sub>50</sub>, LD<sub>01</sub>), inclusiv limite de încredere de 95 % și panta (dacă sunt furnizate de metoda de evaluare);
- relația statistică, inclusiv estimarea exponentului n (protocolul C × t). Se indică denumirea programului informatic statistic;

▼ **M4***Discutarea și interpretarea rezultatelor*

- trebuie să se acorde o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru a satisface criteriile acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;
- potențialul de inhalare a particulelor este abordat în perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot respecta criteriile privind granulometria;
- în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezentau semne de suferință gravă și prelungită, trebuie să se prezinte o explicație, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (8);
- în cazul în care testarea conform capitolului B.52 din prezenta anexă (4) a fost întreruptă în favoarea acestei metode de testare B.2, trebuie să se prezinte justificări;
- evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să includă coerența metodelor folosite la determinarea concentrațiilor nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;
- sunt tratate cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local).

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Disponibilă la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (3) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).
- (4) Capitolul B.52 din prezenta anexă, „Toxicitatea acută prin inhalare – Metoda clasei de toxicitate acută”.
- (5) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)”.
- (6) Capitolul B.40 bis din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testare pe un model de piele umană”.
- (7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibilă la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (10) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques (ediția a doua) Informa Healthcare, New York.

**▼M4**

- (11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation, *Chambers. J., Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.
- (13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.
- (14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989), More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.
- (15) OECD (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and  $C \times t$  Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguide-lines>].
- (16) Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

**DEFINIȚIE**

**Substanță chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

## ▼M4

*Apendicele 1***Protocolul C × t**

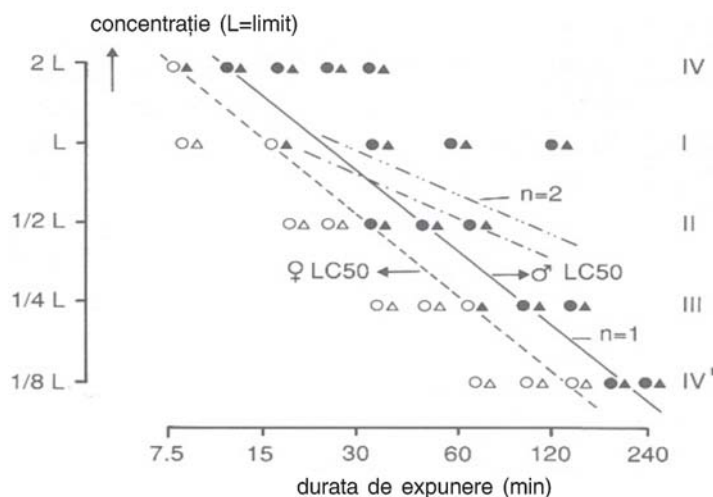
1. Un studiu secvențial concentrație × timp (C × t) poate fi luat în considerare ca alternativă la protocolul tradițional pentru evaluarea toxicității prin inhalare (12) (13) (14). De preferință, el se aplică în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică privind testarea animalelor pe perioade multiple, de exemplu pentru planificarea reacțiilor în situații de urgență sau pentru planificarea folosirii terenurilor. Această metodă începe de obicei prin testarea la o concentrație-limită (sesiunea de expunere I), în cadrul căreia animalele sunt expuse la o substanță chimică testată pentru cinci intervale de timp (de exemplu, 15, 30, 60, 120 și 240 de minute), astfel încât se vor obține durate multiple în cadrul unei sesiuni de expunere (a se vedea figura 1). În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l. Aceste niveluri pot fi depășite doar în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică privind testarea la aceste niveluri (a se vedea punctul 37 din textul principal al B.2).
2. În situațiile în care sunt puține informații sau nu există informații privind toxicitatea unei substanțe chimice testate, se efectuează un studiu de observare în care grupuri de maxim 3 animale din fiecare sex sunt expuse la concentrațiile-țintă selectate de conducătorul studiului, în general timp de 240 min.
3. În cazul în care se testează o concentrație-limită în cursul sesiunii de expunere I și se constată o mortalitate sub 50 %, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică de a stabili relația concentrație/timp/răspuns la niveluri mai mari decât concentrația-limită indicată, următoarea expunere se face la un nivel superior, de exemplu de două ori concentrația-limită (adică 2L în figura 1).
4. Dacă se observă toxicitate la concentrația-limită, este necesară testarea suplimentară (studiul principal). Aceste expuneri suplimentare se fac la concentrații inferioare (în figura 1: Sesiunile de expunere II, III sau IV') sau la concentrații superioare cu durate mai mici (în figura 1: Sesiunea de expunere IV), folosind durate care sunt adaptate și nu sunt separate de intervale atât de mari.
5. Testul (concentrația inițială și concentrațiile suplimentare) se efectuează folosind 1 animal/sex pentru fiecare punct de concentrație/timp sau 2 animale din sexul mai receptiv pentru fiecare punct de concentrație/timp. În anumite circumstanțe, conducătorul studiului poate alege să folosească doi șobolani din fiecare sex pentru fiecare punct de concentrație/timp (sau 4 animale din sexul mai receptiv pentru fiecare punct de concentrație/timp) (15). Utilizarea a 2 animale din fiecare sex pentru fiecare punct de concentrație/timp reduce dezechilibrul și variabilitatea estimărilor, crește rata de succes a estimării și îmbunătățește acoperirea intervalului de încredere privind protocolul descris aici. Detalii suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).
6. În mod ideal, fiecare sesiune de expunere este realizată într-o zi. Acest lucru oferă oportunitatea de amânare a următoarei expuneri până când există un grad de încredere rezonabil privind supraviețuirea și permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația-țintă și duratele pentru următoarea sesiune de expunere. Se recomandă să se înceapă fiecare sesiune de expunere cu grupul care va fi expus cel mai mult, de exemplu grupul de expunere de 240 de minute, urmat de grupul de expunere de 120 de minute și așa mai departe. Dacă, de exemplu, animalele din grupul de 240 de minute mor după 90 de minute sau prezintă semne de toxicitate gravă (de exemplu, modificări extreme în modelul respirator, cum ar fi respirație dificilă), nu ar avea sens să se expună un grup timp de 120 de minute, deoarece mortalitatea ar fi probabil de 100 %. Astfel, conducătorul studiului va selecta durate de expunere mai scurte pentru acea concentrație (de exemplu 90, 65, 45, 33 și 25 de minute).



▼ **M4**

7. Concentrația incintei se măsoară frecvent, pentru a determina concentrația medie ponderată în timp pentru fiecare durată de expunere. De câte ori este posibil, în analiza statistică se folosește momentul morții fiecărui animal (în locul duratei de expunere).
8. Se examinează rezultatele primelor patru sesiuni de expunere pentru a identifica o neconcordanță de date în curba concentrație-timp (a se vedea figura 1). În cazul unei concordanțe insuficiente, se poate efectua o expunere suplimentară (a cincea concentrație). Concentrația și duratele de expunere pentru a cincea expunere sunt alese pentru a acoperi această neconcordanță.
9. Toate sesiunile de expunere (inclusiv prima sesiune de expunere) se vor folosi pentru a calcula relația concentrație-timp-răspuns pe baza analizei statistice (16). Atunci când este posibil, pentru fiecare interval  $C \times t$  se folosește concentrația medie ponderată în timp și durata de expunere până la moarte (dacă moartea intervine în timpul expunerii).

Figura 1

**Ilustrarea ipotetică a relației concentrație-timp-mortalitate la șobolani**

Simboluri goale = supraviețuitori, simboluri pline = animale moarte

Triunghiuri = femele; cercuri = masculi

Linie plină = valori  $LC_{50}$  (domeniu 7,5-240 min) pentru masculi cu  $n = 1$

Linie întreruptă = valori  $LC_{50}$  (domeniu 7,5-240 min) pentru femele cu  $n = 1$

Linii punctate = valori ipotetice  $LC_{50}$  pentru masculi și femele dacă  $n$  ar fi fost egal cu 2 (12).

Glosar

concentrație:

durata de expunere:

▼ **M4**

10. Mai jos se prezintă un exemplu de procedură secvențială:

**Sesiunea de expunere I – Testare la concentrația-limită (a se vedea figura 1)**

- 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total <sup>(a)</sup>
- Concentrație-țintă <sup>(b)</sup> = concentrație-limită.
- Se expun cinci grupuri de animale la această concentrație-țintă pentru durate de 15, 30, 60, 120, respectiv 240 de minute.

↓

**Sesiunea de expunere II <sup>(c)</sup> – Studiul principal**

- 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.
- Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară <sup>(d)</sup> (1/2 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor  $\sqrt{2}$ ; a se vedea figura 1).

↓

**Sesiunea de expunere III – Studiul principal**

- 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.
- Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară <sup>(d)</sup> (1/4 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor  $\sqrt{2}$ ; a se vedea figura 1).

↓

**Sesiunea de expunere IV' – Studiul principal**

- 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.
- Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară <sup>(d)</sup> (1/8 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor  $\sqrt{2}$ ; a se vedea figura 1).

↓ sau

<sup>(a)</sup> Dacă nu sunt disponibile informații privind receptivitatea în funcție de sex, se vor folosi șobolani de ambele sexe, adică 1 animal/sex per concentrație. Pe baza informațiilor existente sau dacă în cursul acestei sesiuni de expunere reiese că un sex este mai receptiv, se vor folosi 10 animale din sexul receptiv (2 animale per punct de concentrație/timp) la fiecare nivel de concentrație în timpul testării ulterioare.

<sup>(b)</sup> În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l. În cazul toxicității anticipate sau pe baza rezultatelor studiului de observare, se aleg concentrații inițiale mai mici. În cazul necesităților de reglementare sau științifice, se pot folosi concentrații mai mari.

<sup>(c)</sup> În mod ideal, expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există un nivel rezonabil de încredere că animalele testate anterior vor supraviețui. Aceasta permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația țintă pentru următoarea sesiune de expunere.

<sup>(d)</sup> Doza minimă (concentrație  $\times$  timp) care a condus la mortalitate în timpul testării la concentrația inițială (prima sesiune de expunere) va fi considerată o indicație pentru a stabili următoarea combinație între concentrație și duratele de expunere. De obicei, concentrația va fi redusă la jumătate (1/2 L) iar animalele vor fi expuse pentru un nou interval de timp cu o grilă mai mică, folosind o diviziune geometrică a perioadelor de expunere cu un factor 1,4 ( $\sqrt{2}$ ; a se vedea referința bibliografică 11) în jurul timpului în conformitate cu nivelul dozei letale minime (timp  $\times$  concentrație) observat la prima expunere. În această figură (figura 1), mortalitatea la sesiunea de expunere I a fost observată inițial la 15 min.; prin urmare, duratele în timpul sesiunii II sunt centrate în jurul valorii de 30 min. și sunt 15, 21, 30, 42 și 60 min. După primele două expuneri, se recomandă să se reprezinte grafic datele într-o figură similară cu cea prezentată mai sus și să se verifice dacă relația între concentrație și timp are un unghi de 45 grade ( $n = 1$ ) sau dacă relația concentrație-timp-răspuns este mai puțin abruptă (de exemplu  $n = 2$ ) sau mai abruptă (de exemplu,  $n = 0,8$ ). În al doilea caz, se recomandă să se adapteze corespunzător concentrațiile și duratele următoare.

**▼ M4****Sesiunea de expunere IV – Studiul principal**

- 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.
- Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație superioară <sup>(e)</sup> (2 L) cu durate de expunere puțin mai mici (eșalonat la un factor  $\sqrt{2}$ ; a se vedea figura 1).

**Interpretarea matematică a rezultatelor pentru protocolul  $C \times t$** 

11. O procedură  $C \times t$  cu 4 sau 5 concentrații de expunere și cinci durate va genera 20, respectiv 25 de puncte experimentale. Cu aceste puncte experimentale, relația  $C \times t$  se poate calcula cu ajutorul analizei statistice (16):

*Ecuția 1:*

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

unde  $C$  = concentrația;  $t$  = durata expunerii sau

*Ecuția 2:*

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

unde  $n = b_1/b_2$ .

Cu ajutorul ecuației 1 se poate calcula valoarea  $LC_{50}$  pentru un interval de timp dat (de exemplu, 4 ore, 1 oră, 30 de minute sau orice interval de timp din domeniul intervalelor testate), folosind  $P = 5$  (50 % răspuns). Trebuie reținut faptul că regula lui Haber se poate aplica doar în cazul în care  $n = 1$ .  $LC_{01}$  se poate calcula folosind  $P = 2,67$ .

<sup>(e)</sup> În anumite cazuri poate fi necesar să se crească concentrația (2 L) pentru un nou domeniu de timp cu o grilă și mai mică, folosind o diviziune geometrică a perioadelor de expunere cu un factor de 1,4 ( $\sqrt{2}$ ) în jurul timpului, în conformitate cu nivelul dozei letale minime observat la prima expunere. Ar fi de preferat ca durata de expunere minimă să depășească 5 minute; iar durata maximă de expunere nu trebuie să depășească 8 ore.

**▼B****B.3. TOXICITATEA ACUTĂ (ADMINISTRARE CUTANATĂ)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera A).

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera B).

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Substanța de testat se aplică pe piele, în doze crescătoare, la mai multe loturi, câte o doză pentru fiecare lot. Ulterior se fac observații cu privire la efectele toxice și mortalitate. Animalele care mor pe perioada testării sunt autopsiate, iar la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare se supun și ele autopsiei.

Animalele care prezintă semne grave de suferință sunt eutanasiate. Se evită administrarea substanțelor cu proprietăți corosive sau iritante în moduri care pot produce suferințe grave.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează la întâmplare în loturile tratate. Cu aproximativ 24 ore înaintea testului, blana din zona dorsală a trunchiului animalelor se tunde sau se rade cu atenție pentru a nu produce escoriații care ar putea altera permeabilitatea pielii. Pentru aplicarea substanței de testat este pregătită cel puțin 10 % din suprafața corpului. Dacă se testează substanțe solide, acestea se umezesc suficient cu apă sau, dacă este necesar, cu un vehicul corespunzător care să asigure un contact bun cu pielea. Dacă se folosește un vehicul, trebuie luată în considerare influența acestuia asupra penetrabilității cutanate. Substanțele lichide testate se folosesc, în general, nediluate.

**1.6.2. Condiții de testare****1.6.2.1. Animale de experiență**

Se folosesc șobolani sau iepuri adulți. Se pot folosi și alte specii, dar folosirea acestora trebuie justificată. Se folosesc animale din liniile obișnuite de laborator. Pentru fiecare sex, la începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de  $\pm 20$  % valoarea medie.

**▼B****1.6.2.2. Număr și sex**

Pentru fiecare doză se folosesc cel puțin 5 animale, de același sex. Dacă se folosesc femele, acestea trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă există informații demonstrate că unul din sexe prezintă o sensibilitate mai mare, vor fi supuse testului animale de sexul respectiv.

Notă: În testele de toxicitate acută efectuate pe animale aparținând unui ordin mai înalt decât rozătoarele se folosesc mai puține animale. Dozele se aleg astfel încât să nu se depășească dozele moderat toxice. În astfel de teste se evită administrarea dozelor letale de substanță de testat.

**1.6.2.3. Doze**

Dozele trebuie alese în număr suficient (cel puțin trei) și astfel încât să producă o gamă de efecte toxice și mortalitate. La alegerea dozelor trebuie luate în considerare eventualele efecte iritante sau corosive. Informațiile trebuie să permită înregistrarea unei curbe doză/răspuns și, unde este posibil, determinarea  $DL_{50}$ .

**1.6.2.4. Testul-limită**

Pe un lot de 5 masculi și 5 femele se poate efectua un test-limită cu doză unică de cel puțin 2 000 mg/kg masă corporală, folosind tehnica descrisă mai sus. Dacă apare mortalitate corelată cu doza, se efectuează un studiu complet.

**1.6.2.5. Perioada de observație**

Perioada de observație este de minimum 14 zile. Cu toate acestea, durata observațiilor nu este fixată în mod rigid, ci se stabilește în funcție de efectele toxice, intensitatea lor la debut și perioada de recuperare. Perioada de observație poate fi extinsă, dacă se consideră necesar. Momentul în care apar și dispar semnele de toxicitate și momentul morții sunt factori importanți, mai ales dacă mortalitatea tinde să fie una tardivă.

**1.6.3. Mod de operare**

Fiecare animal este ținut într-o cușcă individuală. Substanța de testat se aplică uniform pe o porțiune de aproximativ 10 % din suprafața corporală totală. Zona de aplicare poate fi mai redusă în cazul substanțelor foarte toxice, dar se acoperă o suprafață cât mai mare, cu un strat cât se poate de subțire și de uniform.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui bandaj de tifon și al unui plastru neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină bandajul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acestora de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă.

**▼B**

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

În timpul expunerii și după aceasta au loc observații care sunt înregistrate sistematic; pentru fiecare animal se consemnează date individuale. Se fac observații frecvente în prima zi. Cel puțin o dată pe zi lucrătoare, se procedează la o examinare clinică atentă; se fac și alte observații zilnice și se iau măsurile necesare pentru a reduce la minim pierderea animalelor din studiu, cum ar fi autopsia sau congelarea exemplarelor găsite moarte și izolarea sau sacrificarea celor slăbite sau muribunde.

Observațiile vizează modificări ale blănii, pielii tratate, ochilor, mucoaselor, sistemului respirator, circulator, sistemului nervos central și sistemului nervos autonom, ale activității somatomotrice și comportamentului. Trebuie acordată o atenție deosebită următoarelor aspecte: tremor, convulsii, salivă, diaree, letargie, somn și comă. Momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil. Animalele care mor pe parcursul testului și cele care supraviețuiesc la terminarea lui se supun autopsiei. Toate modificările anatomopatologice macroscopice sunt înregistrate. Dacă este astfel indicat, se recoltează țesuturi pentru examenul histopatologic.

#### Evaluarea toxicității la sexul opus

După terminarea studiului pentru unul din sexe, substanța de testat se administrează la cel puțin un lot de 5 animale de sex opus, pentru a stabili dacă animalele care aparțin acestui sex prezintă o sensibilitate mai pronunțată la substanța de testat. În circumstanțe individuale poate fi justificată folosirea unui număr mic de animale. Dacă sunt disponibile informații care demonstrează că animalele aparținând sexului tratat prezintă o sensibilitate mai mare, nu mai este necesară testarea pe animale de sex opus.

## 2. DATE

Datele se sistematizează în tabele. Pentru fiecare lot testat se consemnează: numărul animalelor la începutul testului; momentul morții pentru fiecare animal; numărul de animale care manifestă alte semne de toxicitate; descrierea efectelor toxice; rezultatele autopsiei. Greutatea animalelor este determinată și înregistrată cu puțin timp înaintea aplicării substanței de testat, apoi săptămânal până în momentul decesului; modificările în greutate se calculează și se înregistrează, dacă supraviețuirea depășește o zi. Animalele sacrificate datorită suferinței intense provocate de compusul folosit se înregistrează ca decese datorate efectelor substanței de testat.  $DL_{50}$  se determină printr-o metodă recunoscută.

Rezultatele evaluării cuprind, dacă este posibil, o apreciere a relației între expunerea animalului la substanța de testat și incidența și severitatea tuturor modificărilor apărute, inclusiv: modificări comportamentale și clinice, leziuni macroscopice, variații ale greutății corporale, mortalitate, alte efecte toxice.

## 3. RAPORT

### 3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

**▼B**

- specia, linia, sursa, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;
- condițiile de testare (inclusiv metoda de curățare a pielii și tipul de bandaj: ocluziv sau neocluziv);
- dozele (cu indicarea vehiculului, dacă se folosește, și concentrațiile);
- sexul animalelor tratate;
- tabele cu rezultatele răspunsului, structurate după sex și doză (numărul animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe parcursul testului, numărul animalelor care prezintă semne de toxicitate, numărul animalelor expuse);
- momentul morții după tratament, argumente și criterii folosite pentru eutanasierea animalelor;
- toate observațiile;
- valoarea  $DL_{50}$  (cu specificarea metodei de determinare) pentru sexul care a reprezentat obiectul unui studiu complet pe o perioadă de 14 zile;
- intervalul de încredere 95 % pentru  $DL_{50}$  (când poate fi prezentat);
- curba doză/mortalitate și panta dreptei de regresie, acolo unde permite metoda de determinare;
- rezultatele autopsiei;
- rezultatele histopatologice;
- rezultatele testelor pe sexul opus;
- discutarea rezultatelor (o atenție particulară se acordă efectului pe care numărul animalelor sacrificate pe parcursul testului l-ar putea avea asupra valorii calculate a  $DL_{50}$ );
- interpretarea rezultatelor.

### 3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B (litera D).

### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

A se vedea introducerea generală partea B (litera E).



#### B.4. TOXICITATE ACUTĂ: IRITAȚIE/COROZIUNE DERMICĂ

##### 1. METODĂ

Această metodă este echivalentă cu Orientarea 404 (2002) a OCDE.

##### 1.1. INTRODUCERE

La elaborarea acestei metode actualizate, s-a acordat o atenție deosebită posibilelor îmbunătățiri în ceea ce privește problemele de bunăstare animală și evaluării tuturor informațiilor existente privind substanța de testat pentru a se evita testarea inutilă pe animale de laborator. Această metodă include recomandarea ca, anterior efectuării a testului *in vivo* de iritație/coroziune descris asupra substanței, să se facă o analiză a valorii probante a datelor existente relevante. Dacă datele disponibile sunt insuficiente, ele pot fi dezvoltate prin aplicarea unor teste secvențiale (1). Strategia de testare include efectuarea unor teste *in vitro* validate și acceptate și este prezentată în apendicele la această metodă. În plus, dacă este cazul, se recomandă optarea pentru aplicarea succesivă, și nu simultană, a celor trei plasturi la animalul de experiență în cadrul testului inițial *in vivo*.

În interesul acurateții științifice și al bunăstării animale, testele *in vivo* se efectuează doar după o analiză a valorii probante a tuturor datelor relevante disponibile privind caracterul coroziv/iritant al substanței la nivel dermic. Printre aceste date se numără dovezi din studiile deja efectuate asupra oamenilor și/sau animalelor de laborator, dovezi privind caracterul coroziv/iritant al uneia sau mai multor substanțe chimice înrudite structural sau al unor amestecuri de astfel de substanțe, date demonstrând o puternică aciditate sau alcalinitate a substanței (2) (3) și rezultatele unor teste *in vitro* sau *ex vivo* validate și acceptate (4) (5) (5a). Această analiză ar trebui să reducă necesitatea efectuării unor teste *in vivo* de corozivitate/iritație dermică asupra substanțelor pentru care există deja dovezi suficiente din alte teste privind aceste două puncte finale.

Apendicele la prezenta metodă prezintă o strategie preferată de testare de tip secvențial, care include efectuarea unor teste *in vitro* și *ex vivo* de corozivitate/iritație. Strategia prezentată a fost dezvoltată și recomandată unanim de participanții la un atelier de lucru OCDE (6) și a fost adoptată ca strategie de testare recomandată în Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor chimice (SGA) (7). Se recomandă aplicarea acestei strategii de testare înainte de efectuarea testelor *in vivo*. Pentru substanțele noi, se recomandă o abordare a testelor pe etape pentru obținerea unor date științifice exacte privind caracterul coroziv/iritant al substanței. În cazul substanțelor existente pentru care datele privind corozivitatea/iritația dermică sunt insuficiente, se aplică strategia pentru completarea datelor lipsă. Utilizarea unei strategii sau proceduri diferite de testare sau decizia de a nu utiliza o abordare a testării pe etape trebuie justificată.

În cazul în care analiza valorii probante a datelor, în conformitate cu strategia de testare secvențială, nu permite determinarea caracterului coroziv sau iritant, se ia în considerare un test *in vivo* (a se vedea apendicele).



**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Iritație dermică:** constă în producerea unor leziuni cutanate reversibile ca urmare a aplicării unei substanțe de testat timp de maximum patru ore.

**Coroziune dermică:** constă în producerea unor leziuni cutanate ireversibile; mai exact, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe de testat timp de maximum patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Leziunile suspecte se supun unui examen histopatologic.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se aplică într-o singură doză pe pielea unui animal de experiență; zonele netratate ale pielii animalului de experiență se utilizează ca martor. La intervale specificate se examinează și se punctează gradul de iritare/coroziune, care este descris în detaliu pentru a permite o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru evaluarea reversibilității sau ireversibilității efectelor observate.

Animalele care manifestă semne persistente de suferință profundă și/sau durere în orice etapă a testului sunt eutanasiate, iar substanța este evaluată în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde pot fi consultate în referința (8).

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. Pregătirea testului *in vivo*1.4.1.1. *Selectarea speciei de animale*

Se utilizează, de preferat, exemplare adulte tinere, sănătoase, de iepure albinos. Utilizarea altor specii trebuie justificată.

1.4.1.2. *Pregătirea animalelor*

Cu aproximativ 24 de ore înainte de test, se rade blana din regiunea dorsală de pe corpul animalelor. Se evită cu atenție jupuirea pielii și se utilizează exclusiv animalele cu pielea sănătoasă, intactă.

La unele sușe de iepuri, blana este mai deasă în unele zone, în anumite perioade ale anului. Zonele în cauză nu se utilizează ca zone de testare.

1.4.1.3. *Condiții de adăpostire și de hrănire*

Animalele se adăpostesc individual. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență, se asigură o temperatură de 20 °C ( $\pm$  3 °C) pentru iepuri. Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

**▼B****1.4.2. Procedura de testare****1.4.2.1. Aplicarea substanței de testat**

Substanța de testat se alică pe o suprafață redusă (aproximativ 6 cm<sup>2</sup> a pielii și se acoperă cu o compresă de tifon, care se fixează cu plasture care nu irită. În cazurile în care nu este posibilă aplicarea directă (de exemplu, în cazul lichidelor și al unor paste), substanța de testat se aplică mai întâi pe compresa de tifon, care se aplică apoi pe piele. Se asigură un contact ușor între compresă și piele cu ajutorul unui pansament semi-ocluziv pentru întreaga durată a perioadei de expunere. Dacă substanța de testat se aplică pe compresă, aceasta se fixează pe piele astfel încât să se asigure un contact adecvat și o distribuție uniformă a substanței pe piele. Este necesar să se prevină accesul animalului la compresă și ingerarea sau inhalarea substanței de testat.

Substanțele de testat lichide se utilizează, în general, nediluate. La testarea solidelor (care pot fi pulverizate, dacă este necesar), substanța solidă se înmoaie cu cea mai mică cantitate de apă (sau, dacă este necesar, cu un alt vehicul adecvat) suficientă pentru a asigura un contact adecvat cu pielea. Dacă se utilizează alte vehicule decât apa, potențiala influență a vehiculului asupra iritației provocate de substanță la nivel dermic trebuie să fie minimă sau nulă.

La sfârșitul perioadei de expunere, care este, în mod normal, de 4 ore, reziduurile de substanță de testat se îndepărtează, dacă este posibil, cu apă sau un solvent adecvat fără a se modifica reacția existentă sau integritatea epidermei.

**1.4.2.2. Nivelul dozei**

Pe zona de testare se aplică o doză de 0,5 ml de lichid sau de 0,5 g de substanță solidă sau pastă.

**1.4.2.3. Testul inițial (test *in vivo* de iritație/coroziune dermică utilizând un animal)**

Se recomandă ca testul *in vivo* să se efectueze inițial pe un singur animal, în special dacă substanța de testat riscă să fie corozivă. Această abordare este consecventă cu strategia de testare secvențială (a se vedea appendicele 1).

Dacă se stabilește, pe baza analizei valorii probante a datelor, că o substanță este corozivă, nu este necesară testarea pe animale. Pentru cele mai multe substanțe care sunt considerate corozive, nu sunt, în mod normal, necesare teste suplimentare *in vivo*. Cu toate acestea, în cazurile în care se justifică obținerea de date suplimentare având în vedere dovezile insuficiente, se pot efectua teste restrânse, utilizând următoarea abordare: Se aplică animalului, secvențial, maximum trei plasturi. Primul plastur se îndepărtează după trei minute. Dacă nu se observă o reacție cutanată serioasă, se aplică al doilea plastur, care se îndepărtează după o oră. Dacă în această etapă, observațiile arată că poate fi permisă prelungirea expunerii la patru ore, fără a cauza suferințe, se aplică un al treilea plastur, care se îndepărtează după patru ore și se punctează reacția.

Dacă se observă un efect coroziv după oricare dintre cele trei expuneri secvențiale, testul se încheie. Dacă nu se observă un efect coroziv după îndepărtarea ultimului plastur, animalul se observă timp de 14 zile, cu excepția cazului în care corозиunea se manifestă mai devreme.

**▼B**

În cazurile în care se estimează că substanța de testat nu este corozivă, dar ar putea fi iritantă, se aplică un singur platură unui animal, timp de patru ore.

1.4.2.4. *Teste de confirmare (test de iritare in vivo pe animale suplimentare)*

Dacă la testul inițial nu se observă efecte corozive, reacția de iritație sau negativă se confirmă prin testarea a maximum alte două animale, fiecare cu câte un platură, cu o perioadă de expunere de patru ore. Dacă se observă un efect iritant la testul inițial, testul de confirmare poate fi efectuat secvențial sau prin expunerea simultană a celor două animale suplimentare. În cazul excepțional în care nu se efectuează testul inițial, două sau trei animale pot fi tratate cu câte un singur platură, care se îndepărtează după patru ore. Dacă se utilizează două animale și ambele manifestă aceeași reacție, nu mai sunt necesare teste suplimentare. În caz contrar, se testează și al treilea animal. Este posibil să fie necesară evaluarea reacțiilor echivoce utilizând alte animale.

1.4.2.5. *Perioada de observare*

Durata perioadei de observare trebuie să fie suficientă pentru evaluarea completă a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul se încheie dacă animalul prezintă semne persistente de durere sau suferință profundă. Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele se observă timp de până la 14 zile de la îndepărtarea platurilor. Dacă reversibilitatea intervine înainte de 14 zile, experimentul se încheie în acel moment.

1.4.2.6. *Observații clinice și punctarea reacțiilor cutanate*

Se examinează semnele de eritem și edem la toate animalele și se punctează reacțiile la 60 de minute, iar apoi la 24, 48 și 72 de ore de la îndepărtarea platurilor. Pentru testul inițial pe un singur animal, zona de testare se examinează, de asemenea, imediat după îndepărtarea platurii. Reacțiile dermice se punctează și se înregistrează conform punctajelor din tabelul de mai jos. Dacă la 72 de ore se observă leziuni cutanate care nu pot fi identificate ca iritații sau corozii, este posibil să fie necesară observarea timp de 14 zile, pentru a determina reversibilitatea efectelor. În plus față de examinarea iritației, se descriu și se înregistrează toate efectele toxice locale, precum uscarea pielii, și orice efecte sistemice adverse (de exemplu, efecte manifestate prin semne clinice de toxicitate sau efecte asupra greutatei corporale). Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se efectuează un examen histopatologic.

Punctarea reacțiilor cutanate este evident subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor cutanate și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și a persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de punctaj utilizat (a se vedea tabelul de mai jos). Ar putea fi util un ghid ilustrat pentru punctarea iritațiilor dermice și a altor leziuni (9).

2. **DATE**

2.1. **PREZENTAREA REZULTATELOR**

Rezultatele studiului se rezumă în formă tabelară în raportul final al testului și includ toate punctele prevăzute la punctul 3.1.

**▼B****2.2. EVALUAREA REZULTATELOR**

Punctajele de iritație dermică se evaluează în legătură cu natura și severitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea lor. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale materialului, întrucât se evaluează și alte efecte ale materialului de testat. În schimb, punctajele individuale trebuie privite ca valori de referință, care se evaluează în legătură cu toate celelalte observații ale studiului.

Reversibilitatea leziunilor cutanate se ia în considerare la evaluarea reacțiilor iritante. Dacă reacțiile precum alopecia (zonă limitată), hiperkeratoza, hiperplazia și exfolierea persistă la sfârșitul perioadei de observare de 14 zile, substanța de testat se consideră a fi iritantă.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații:

Motivația pentru testarea *in vivo*: analiza valorii probante a datelor prealabile testului, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale:

- descrierea datelor relevante disponibile înaintea testului;
- date obținute în fiecare etapă a strategiei de testare;
- descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detaliile procedurilor, rezultatele obținute cu substanțele de testat/de referință;
- analiza valorii probante pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța de testat:

- date de identificare (de exemplu, numărul CAS; sursă; puritate; impurități cunoscute; numărul lotului);
- natura fizică și proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH, volatilitate, solubilitate, stabilitate);
- pentru amestecuri, compoziția și procente relative ale componentelor.

Vehicul:

- identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;
- justificarea alegerii vehiculului.

Animale de experiență:

- specie/sușă utilizată, motivație pentru utilizarea altor animale decât iepurele albinos;
- numărul de animale din fiecare sex;
- greutatea fiecărui animal la începutul și la finalul testului;
- vârsta la începutul studiului;
- sursa animalelor, condiții de adăpostire, hrănire etc.

**▼B**

Condiții de testare:

- tehnica pregătirii zonei de aplicare a plasturelui;
- detalii privind materialele utilizate pentru plasturi și metodele de aplicare;
- detalii privind prepararea, aplicarea și îndepărtarea substanței de testat.

Rezultate:

- tabel cu punctajul acordat reacției de iritație/coroziune pentru fiecare animal în fiecare moment de observare prestabilit;
- descrierea tuturor leziunilor observate;
- descrierea narativă a naturii și gradului de iritație/coroziune observat și concluziile examenului histopatologic;
- descrierea altor efecte locale adverse (de exemplu, uscarea pielii) și a altor efecte sistemice apărute în plus față de iritația sau corozivitatea dermică.
- Discutarea rezultatelor.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Barratt, M. D., Castell, J. V., Chamberlain, M., Combes, R. D., Dearden, J. C., Fentem, J. H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T. J. B., Livingston, D. J., Provan, W. M., Rutten, F. A. J. J. L., Verhaar, H. J. M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
2. Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
3. Worth, A. P., Fentem, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Eadsail, D. J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
4. ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation”, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
5. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Eadsail, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro* 12, pp.483-524.
- 5a. Metoda de testare B.40 Corozivitatea cutanată.
6. OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm>).
7. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

**▼B**

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm>).
9. EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Disponibil la cerere la Secretariatul OCDE].

[Disponibile, la cerere, la secretariatul OCDE.]



Tabelul 1

**PUNCTAREA REACȚIILOR CUTANATE****Formarea de eriteme și escare**

|  |   |
|--|---|
| Fără eritem .....  | 0 |
| Eritem foarte ușor (abia perceptibil) .....  | 1 |
| Eritem bine definit .....  | 2 |
| Eritem moderat spre grav .....   | 3 |
| Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului ..... | 4 |

Maximum posibil: 4

**Formarea de edeme**

|   |   |
|---|---|
| Fără edem .....   | 0 |
| Edem foarte ușor (abia perceptibil) .....                                 | 1 |
| Edem ușor (marginile zonei bine definite printr-o umflătură vizibilă) ... | 2 |
| Edem moderat (umflătură de aproximativ 1 mm) .....                        | 3 |
| Edem grav (umflătură de peste 1 mm extins în afara zonei de expunere)     | 4 |

Maximum posibil: 4

Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se procedează la un examen histopatologic.



## APENDICE

### O strategie de testare secvențială pentru iritație și corозиune dermică

#### CONSIDERENTE GENERALE

În interesul acurateții științifice și al bunăstării animale, este important să se evite utilizarea inutilă a animalelor de experiență și să se reducă la minimum testările care pot produce reacții grave la animale. Este necesar să se evalueze toate informațiile privind o substanță care sunt relevante pentru potențialul său caracter coroziv/iritant la nivel dermic înainte de luarea în considerare a testării *in vivo*. Este posibil să existe deja date suficiente pentru clasificarea unei substanțe de testat din punctul de vedere al potențialului său coroziv/iritant la nivel dermic, fără a mai fi necesar să se efectueze teste pe animale de laborator. Prin urmare, prin utilizarea unei analize a valorii probante a datelor și a unei strategii de testare secvențiale, se reduce la minimum necesitatea de a efectua teste *in vivo*, în special dacă substanța are potențialul de a produce reacții grave.

Se recomandă utilizarea unei analize a valorii probante a datelor pentru a evalua informațiile existente privind potențialul iritant și coroziv al substanțelor la nivel dermic și a stabili dacă este necesară efectuarea unor teste suplimentare, altele decât studii dermice *in vivo*, pentru caracterizarea acestui potențial. Dacă sunt necesare studii suplimentare, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor experimentale relevante. Pentru substanțele care nu au fost testate anterior, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea setului de date necesare pentru evaluarea potențialului său coroziv/iritant la nivel dermic. Strategia de testare descrisă în prezentul appendice a fost dezvoltată în cadrul unui atelier de lucru OCDE (1) și a fost ulterior susținută și extinsă în cadrul Sistemului armonizat integrat de clasificare a riscurilor substanțelor chimice pentru sănătatea oamenilor și mediu (Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adoptată la a 28-a reuniune comună a Comitetului pentru substanțe chimice și a Grupului de lucru pentru substanțe chimice, în noiembrie 1998 (2).

Deși această strategie de testare secvențială nu face parte integrantă din metoda de testare B.4, ea reprezintă abordarea recomandată pentru determinarea caracteristicilor iritante/corozive la nivel dermic. Această abordare reprezintă atât cea mai bună practică, cât și un reper etic pentru testarea *in vivo* pentru iritație/corозиune dermică. Metoda de testare oferă indicații pentru efectuarea testului *in vivo* și rezumă factorii care trebuie evaluați înainte de un astfel de test. Strategia oferă o abordare pentru evaluarea datelor existente privind proprietățile iritante/corozive la nivel dermic ale substanțelor de testat și o abordare graduală pentru generarea datelor relevante pentru substanțele pentru care sunt necesare studii suplimentare sau care nu au făcut încă obiectul unor studii. Strategia recomandă, de asemenea, efectuarea unor teste *in vitro* sau *ex vivo* validate și acceptate pentru corозиune/iritație dermică în condiții specifice.

#### DESCRIEREA STRATEGIEI DE EVALUARE ȘI TESTARE

Înainte de efectuarea testelor incluse în strategia de testare secvențială (figură), se evaluează toate informațiile disponibile pentru a stabili dacă este necesară testarea cutanată *in vivo*. Deși se pot obține informații semnificative din evaluarea unor parametri specifici (de exemplu, o valoare extremă a pH-ului), se iau în considerare toate informațiile existente. Se evaluează toate datele relevante privind efectele substanței în cauză și a analogilor săi pentru adoptarea unei decizii prin analiza valorii probante a datelor și se prezintă motivele care stau la baza deciziei. Se acordă o atenție specială datelor privind efectele substanței asupra oamenilor și animalelor, apoi rezultatelor testelor *in vitro* sau *ex vivo*. Se evită, ori de câte ori este posibil, efectuarea unor studii *in vivo* pentru substanțele corozive. Factorii luați în considerare în strategia de testare includ:



## ▼B

*Evaluarea datelor privind efectele asupra oamenilor și animalelor (Etapa 1).* Se iau în primul rând în considerare datele existente privind efectele asupra oamenilor, de exemplu studii clinice și ocupaționale sau studii de caz, și/sau date obținute în cadrul unor teste asupra animalelor, de exemplu studii privind toxicitatea dermică la o singură expunere sau expuneri repetate, deoarece acestea furnizează informații direct legate de efectele cutanate. Nu este necesar să se efectueze studii *in vivo* asupra substanțelor cu caracter iritant sau coroziv cunoscut și a celor pentru care există date clare că nu sunt corozive sau iritante.

*Analiza relațiilor structură-activitate (RSA) (Etapa 2).* Se iau în considerare rezultatele testelor asupra substanțelor înrudite din punct de vedere structural, dacă sunt disponibile. Dacă sunt disponibile suficiente date privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor ale unor substanțe înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe care indică un potențial coroziv/iritant la nivel dermic, se poate presupune că substanța în curs de evaluare va produce aceleași reacții. În astfel de cazuri, este posibil să nu fie necesare teste asupra substanței în cauză. Datele negative obținute de studiile asupra substanțelor înrudite structural sau asupra amestecurilor de astfel de substanțe nu constituie dovezi suficiente pentru caracterul necoroziv/neiritant al substanței supuse strategiei de testare secvențiale. Se utilizează abordări RSA validate și acceptate pentru a identifica atât potențialul de coroziune dermică, cât și cel de iritație dermică.

*Proprietățile fizico-chimice și reactivitatea chimică (Etapa 3).* Substanțele care prezintă valori extreme ale pH-ului, precum  $\leq 2,0$  și  $\geq 11,5$  pot produce efecte locale puternice. Dacă valorile extreme ale pH-ului constituie baza pentru identificarea unei substanțe ca fiind corozivă la nivel dermic, atunci se poate lua în considerare și rezerva sa acidă/alkalină (sau capacitatea de tamponare) (3) (4). În cazul în care capacitatea de tamponare sugerează că este posibil ca substanța să nu fie corozivă la nivel dermic, se efectuează teste suplimentare pentru confirmare, de preferat prin utilizarea unui test *in vitro* sau *ex vivo* validat și acceptat (a se vedea etapele 5 și 6).

*Toxicitatea dermică (Etapa 4).* Dacă o substanță chimică s-a dovedit foarte toxică pe cale dermică, există riscul ca efectuarea un studiu *in vivo* de iritație/coroziune dermică să nu fie posibilă, întrucât cantitatea de substanță de testat aplicată în mod normal ar putea depăși doza foarte toxică și, prin urmare, ar putea provoca moartea sau suferință profundă animalelor. În plus, dacă au fost deja efectuate teste de toxicitate dermică pe iepuri albi, până la un nivel-limită al dozei de 2 000 mg/kg greutate corporală sau mai mare, fără să se observe iritații sau corozii dermice, nu sunt necesare teste suplimentare pentru iritație/coroziune dermică. La evaluarea toxicității dermice acute determinate în studiile anterioare se iau în considerare o serie de factori. De exemplu, informațiile raportate privind leziunile dermice pot fi incomplete. Este posibil ca testarea și observațiile să se fi făcut pe alte specii decât pe iepurele albi, iar speciile pot prezenta diferențe semnificative din punctul de vedere al sensibilității reacțiilor lor. De asemenea, este posibil ca forma substanței de testat aplicate pe animale să nu fi fost adecvată pentru evaluarea iritației/coroziunii dermice [de exemplu, diluarea substanțelor pentru testarea toxicității dermice (5)]. Cu toate acestea, în cazurile în care au fost efectuate teste concepute și desfășurate corespunzător pe iepuri, concluziile negative pot fi considerate dovezi suficiente că substanța nu este corozivă sau iritantă.

*Rezultatele testelor in vitro sau ex vivo (Etapile 5 și 6).* Substanțele care au prezentat proprietăți corozive sau puternic iritante într-un test *in vitro* sau *ex vivo* validat și acceptat (6) (7) conceput pentru evaluarea acestor efecte specifice, nu trebuie să fie testate pe animale. Se poate presupune că substanțele în cauză vor produce efecte la fel de puternice *in vivo*.

**▼B**

*Testul in vivo pe iepuri (Etapele 7 și 8).* În cazul în care, în urma analizei valorii probante a datelor, se ia decizia efectuării unui test *in vivo*, se începe printr-un test inițial pe un singur animal. Dacă rezultatele acestui test arată că substanța este corozivă la nivel dermic, nu se efectuează teste suplimentare. Dacă în cadrul testului inițial nu se observă efecte corozive, efectul iritant sau negativ se confirmă utilizând maximum alte două animale, cu o perioadă de expunere de patru ore. Dacă în cadrul testului inițial se observă un efect iritant, testul de confirmare poate fi efectuat secvențial sau prin expunerea altor două animale simultan.

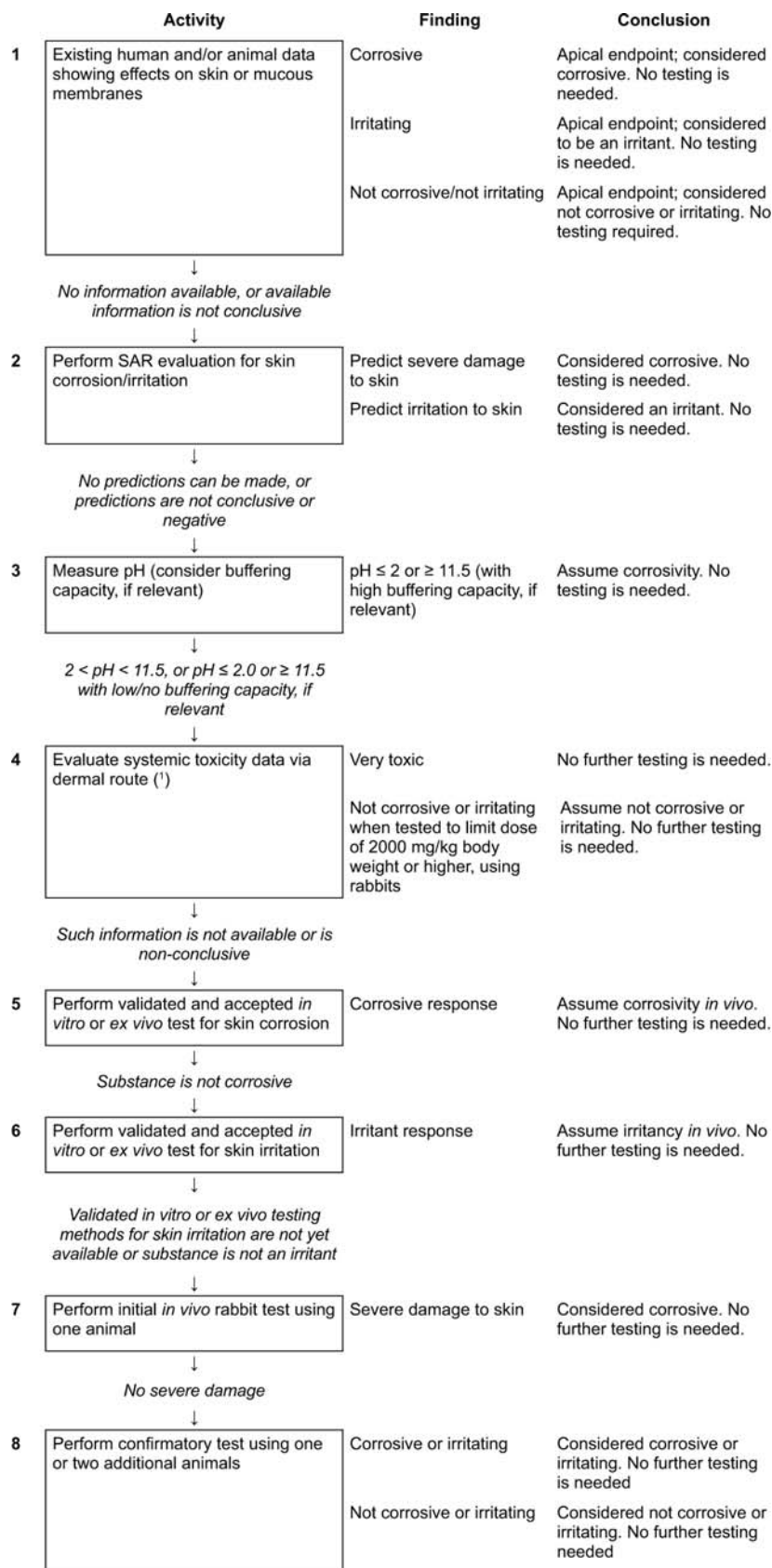
#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
2. OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
3. Worth, A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdaile D. J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
4. Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth, W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In vitro*, 2 (1) pp. 19-26.
5. Patil, S. M., Patrick, E., Maibach, H. I. (1996) Animal, Human, and *In Vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, pp. 411-436.
6. Metoda de testare B.40.
7. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483-524.



Figură

## STRATEGIE DE TESTARE ȘI EVALUARE A IRITAȚIEI/COROZIUNII DERMICE

<sup>(1)</sup> can be considered before Steps 2 and 3.

**▼B****B.5. TOXICITATE ACUTĂ: IRITAȚIE/COROZIUNE OCULARĂ****1. METODĂ**

Această metodă este echivalentă cu Orientarea 405 (2002) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

La elaborarea acestei metode actualizate s-a acordat o atenție deosebită posibilităților îmbunătățiri prin evaluarea tuturor informațiilor existente privind substanța de testat, astfel încât să se evite testarea inutilă pe animale de laborator și, prin urmare, pentru soluționarea problemelor de bunăstare animală. Această metodă include recomandarea ca, înainte de a se efectua testul *in vivo* descris pentru coroziiune/iritație oculară acută, să se facă o analiză a valorii probante a datelor relevante (1). Dacă datele disponibile sunt insuficiente, se recomandă dezvoltarea acestora prin aplicarea unor teste secvențiale (2) (3). Strategia de testare include efectuarea unor teste *in vitro* validate și acceptate și este prezentată ca apendice la această metodă de testare. În plus, se recomandă utilizarea unui test *in vivo* de iritație/coroziune dermică pentru a face o estimare a coroziiunii oculare, înainte de a se lua în considerare efectuarea unui test ocular *in vivo*.

În interesul acurateții științifice și al bunăstării animale, testele *in vivo* se efectuează doar după o analiză a valorii probante a tuturor datelor disponibile relevante pentru potențialul de coroziiune/iritație oculară al substanței. Printre aceste date se numără dovezi din studiile deja efectuate asupra oamenilor și/sau animalelor de laborator, dovezi privind caracterul coroziv/iritant al uneia sau mai multor substanțe chimice înrudite structural sau al unor amestecuri de astfel de substanțe, date demonstrând o puternică aciditate sau alcalinitate a substanței (4) (5) și rezultatele unor teste *in vitro* sau *ex vitro* de coroziiune și iritație dermică validate și acceptate (6) (6a). Este posibil ca aceste studii să fi fost efectuate înainte de sau ca urmare a analizei valorii probante a datelor.

Pentru anumite substanțe, o astfel de analiză poate indica necesitatea efectuării unor studii *in vivo* privind potențialul de coroziiune/iritație oculară al substanței. În toate aceste cazuri, înainte de a lua în considerare efectuarea testului ocular *in vivo*, este de preferat să se efectueze un studiu asupra efectelor cutanate *in vivo* ale substanței și o evaluare în conformitate cu metoda de testare B.4 (7). Efectuarea unei analize a valorii probante a datelor și aplicarea strategiei de testare secvențiale ar trebui să reducă necesitatea efectuării unor teste *in vivo* de coroziiune/iritație oculară asupra substanțelor pentru care există deja date suficiente obținute în cadrul altor studii. Dacă potențialul de coroziiune și iritație oculară nu se poate determina prin aplicarea strategiei de testare secvențiale, chiar după efectuarea unui studiu *in vivo* de coroziiune și iritație dermică, se poate trece la efectuarea unui test *in vivo* de coroziiune/iritație oculară.

## ▼B

Apendicele la prezenta metodă prezintă o strategie de testare secvențială preferată, care include efectuarea unor teste *in vitro* sau *ex vivo* de corозиune/iritație. Strategia a fost dezvoltată și unanim recomandată de participanții la un atelier de lucru OCDE (8), iar ulterior a fost adoptată ca strategie de testare recomandată în Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor chimice (SGA) (9). Se recomandă aplicarea acestei strategii de testare înainte de efectuarea testelor *in vivo*. Pentru substanțe noi, este abordarea recomandată pentru testarea secvențială în vederea dezvoltării unor date științifice fiabile privind caracterul coroziv/iritant al substanței. În cazul substanțelor existente pentru care există date insuficiente privind corозиunea/iritația dermică și oculară, strategia se utilizează pentru obținerea unor date complete. Utilizarea unei strategii sau proceduri diferite de testare sau decizia de a nu aplica o abordare de testare secvențială trebuie motivată.

## 1.2. DEFINIȚII

**Iritație oculară:** reprezintă producerea unor modificări oculare ca urmare a aplicării unei substanțe de testat pe suprafața anterioară ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare.

**Corозиune oculară:** reprezintă producerea unor leziuni tisulare la nivelul ochiului sau a unei deteriorări grave a vederii, ca urmare a aplicării unei substanțe de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se aplică, într-o singură doză, pe un ochi al animalului de experiență, celălalt ochi fiind utilizat ca martor. Nivelul de iritație/corозиune oculară se evaluează prin acordarea unui punctaj leziunilor care afectează conjunctiva, corneea și irisul, la intervale prestabilite. Se descriu, de asemenea, celelalte efecte asupra ochiului sau efecte sistemice adverse, pentru a asigura o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru a evalua reversibilitatea sau ireversibilitatea efectelor.

Animalele care manifestă semne persistente de suferință și/sau dureri profunde în orice etapă a testului sunt eutanasiate, iar substanța se evaluează în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde sunt prezentate în referința 10.

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. Pregătirea pentru testul *in vivo*

## 1.4.1.1. Selectarea speciei

Se utilizează, de preferat, exemplare adulte tinere, sănătoase, de iepure albinos. Utilizarea altor sușe sau specii trebuie justificată.

## 1.4.1.2. Pregătirea animalelor

Cu 24 de ore înainte de începerea testului se examinează ambii ochi ai animalului de experiență selectat provizoriu. Nu se utilizează animalele care prezintă iritații sau defecte oculare sau leziuni corneene preexistente.

**▼B****1.4.1.3. Condiții de adăpostire și de hrănire**

Animalele se adăpostesc individual. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 20 °C ( $\pm 3$  °C) pentru iepuri. Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

**1.4.2. Procedura de testare****1.4.2.1. Aplicarea substanței de testat**

Substanța de testat se aplică în sacul conjunctival al unui ochi al fiecărui animal, după îndepărtarea delicată a pleoapei inferioare de pe globul ocular. Pleoapele se țin apoi lipite pentru circa o secundă, pentru a preveni pierderea materialului. Celălalt ochi, care nu se tratează, se utilizează ca martor.

**1.4.2.2. Irigația**

Ochii animalelor testate nu se spală timp de cel puțin 24 de ore de la instilația substanței de testat, cu excepția cazului în care substanța este solidă (a se vedea punctul 1.4.2.3.2) și a cazului în care apar efecte corozive sau iritante imediate. După 24 de ore, se procedează la o spălare, dacă se consideră necesar.

Nu se recomandă utilizarea unui grup satelit de animale pentru a analiza influența spălării, cu excepția cazului în care este justificată științific. Dacă este necesar un grup satelit, se folosesc doi iepuri. Se descriu detaliat condițiile de spălare, precizând momentul spălării; compoziția și temperatura soluției utilizate; durata, volumul și viteza de aplicare.

**1.4.2.3. Nivelul dozei****1.4.2.3.1. Testarea lichidelor**

Pentru testarea lichidelor se utilizează o doză de 0,1 ml. Nu se utilizează pulverizatoare cu pompă pentru instilarea substanței direct în ochi. Se recomandă extragerea lichidului și colectarea sa într-un container înainte de instilarea a 0,1 ml în ochi.

**1.4.2.3.2. Testarea solidelor**

La testarea solidelor, a pastelor și a substanțelor sub formă de particule, cantitatea utilizată are un volum de 0,1 ml sau o greutate de cel mult 100 mg. Materialul de testat se macină într-un praf fin. Volumul materialului solid se măsoară după o compactare delicată, de exemplu bătând ușor cu palma recipientul de măsură. Dacă substanța solidă de testat nu a fost îndepărtată din ochiul animalului de experiență prin mecanisme fiziologice în primul moment prestabilit de observare, și anume la o oră după tratament, ochiul poate fi spălat cu o soluție salină sau cu apă distilată.

## ▼B

1.4.2.3.3. *Testarea aerosolilor*

Se recomandă colectarea conținutului tuturor pulverizatoarelor cu pompă și aerosolilor înainte de instilarea în ochi. Singura excepție o constituie substanțele în containere sub presiune pentru aerosoli, care nu pot fi colectate din cauza vaporizării. În acest caz, ochiul se ține deschis, iar substanța de testat se administrează în ochi cu un singur jet de circa o secundă, de la o distanță de 10 cm perpendicular pe ochi. Distanța poate varia în funcție de presiunea pulverizatorului și a conținutului său. Se evită lezarea ochiului din cauza presiunii pulverizatorului. În unele cazuri, se poate dovedi necesar să se evalueze posibilitatea provocării unor leziuni „mecanice” ochiului prin forța pulverizatorului.

Se poate face o estimare a dozei dintr-un aerosol simulând testul astfel: substanța se pulverizează pe o bucată de hârtie de cântărit, printr-o deschidere de dimensiunea ochiului unui iepure amplasată direct în fața hârtiei. Cantitatea pulverizată în ochi se estimează pe baza creșterii greutatei hârtiei. Pentru substanțele volatile, doza poate fi estimată prin cântărirea unui recipient în care este pulverizată substanța, înainte și după îndepărtarea materialului de testat.

1.4.2.4. *Testul inițial (Test in vivo de iritație/coroziune oculară pe un animal)*

Așa cum se precizează în strategia de testare secvențială (a se vedea apendicele), se recomandă ca testul *in vivo* să se efectueze pentru început pe un singur animal.

Dacă rezultatul acestui test, obținut conform procedurii descrise, arată că substanța este corozivă sau foarte iritantă la nivel ocular, nu se efectuează teste suplimentare de iritație oculară.

1.4.2.5. *Anestezice locale*

Se pot utiliza anestezice locale de la caz la caz. Dacă analiza valorii probante a datelor arată că este posibil ca substanța să provoace durere sau dacă testul inițial arată că va avea loc o reacție dureroasă, se poate aplica un anestezic local înainte de instilarea substanței de testat. Se alege cu atenție tipul, concentrația și doza de anestezic local pentru a se asigura că utilizarea anestezicului nu determină reacții diferite la substanța de testat. Se anesteziază în mod similar și ochiul martor.

1.4.2.6. *Testul de confirmare (Test in vivo de iritație oculară pe alte animale)*

Dacă la testul inițial nu se observă un efect coroziv, reacția iritantă sau negativă se confirmă utilizând maximum alte două animale. Dacă la testul inițial se observă un efect puternic iritant care indică posibilitatea provocării unui efect puternic (ireversibil) în cadrul testului de confirmare, se recomandă ca testul de confirmare să se efectueze secvențial, pe câte un animal, și nu prin expunerea simultană a ambelor animale. Dacă la al doilea animal apar efecte corozive sau puternic iritante, testul se întrerupe. Este posibil să fie necesară testarea altor animale pentru confirmarea unor reacții iritante slabe sau moderate.

**▼B****1.4.2.7. Perioada de observație**

Durata perioadei de observație trebuie să fie suficientă pentru evaluarea completă a amplitudinii și a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul se încheie în momentul în care animalul manifestă semne persistente de suferință sau dureri profunde (9). Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele sunt puse observație timp de 21 de zile după administrarea substanței de testat. Dacă reversibilitatea intervine înainte de expirarea celor 21 de zile, experimentul se încheie în acel moment.

**1.4.2.7.1. Observații clinice și punctarea reacțiilor oculare**

Ochii se examinează la 1, 24, 48 și 72 de ore de la aplicarea substanței de testat. Animalele nu sunt menținute în experiment mai mult decât este necesar pentru obținerea unor informații concludente. Animalele care prezintă semne persistente de durere sau suferință profunde sunt eutanasiate imediat, iar substanța se evaluează în consecință. Animalele care după instilare prezintă următoarele leziuni oculare sunt eutanasiate: perforare corneană sau ulcerare corneană semnificativă, inclusiv stafilm; sânge în camera anterioară a ochiului; opacitate corneană de gradul 4 care persistă timp de 48 de ore; absența reflexului fotomotor (reacție a irisului de gradul 2) care persistă timp de 72 de ore; ulcerare a membranei conjunctivale; necroză a conjunctivelor și a membranei nictitante; sau desprinderea țesutului necrozat. Eutanasierea se justifică întrucât astfel de leziuni sunt, în general, ireversibile.

Animalele care nu prezintă leziuni oculare pot fi eutanasiate după cel puțin 3 zile de la instilare. Animalele care prezintă leziuni ușoare și moderate sunt supuse observației până la dispariția leziunilor sau timp de 21 de zile, moment în care studiul se încheie. Animalele sunt examinate la 7, 14 și 21 de zile, pentru a determina starea, reversibilitatea sau ireversibilitatea leziunilor.

Nivelul reacției oculare (conjunctive, cornee și iris) se înregistrează la fiecare examinare (tabelul I). Se înregistrează, de asemenea, orice altă leziune oculară (de exemplu, panus, colorare) și orice efecte sistemice adverse.

Pentru a facilita examinarea reacțiilor, se pot utiliza o lupă binoculară, o lampă portabilă cu fantă, un biomicroscop sau un alt dispozitiv adecvat. După înregistrarea observațiilor la 24 de ore, examinarea ochilor se poate face cu ajutorul fluoresceinei.

Punctarea reacțiilor oculare este evident subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor oculare și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și a persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de punctaj utilizat.

**2. DATE****2.2. EVALUAREA REZULTATELOR**

Punctajele iritației oculare se evaluează în legătură cu natura și gravitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea acestora. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale unui material de testat, întrucât se evaluează și alte efecte ale materialului. În schimb, punctajele individuale trebuie privite ca valori de referință și nu sunt semnificative decât dacă sunt însoțite de o descriere și o evaluare completă a tuturor observațiilor.



**▼B****3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații:

Motivația pentru testarea *in vivo*: analiza valorii probante a datelor existente din teste anterioare, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale

- descrierea datelor relevante disponibile din testele anterioare;
- date derivate din fiecare etapă a strategiei de testare;
- descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detalii privind procedurile, rezultatele obținute cu substanțele de testat/de referință;
- descrierea studiului *in vivo* de iritație/coroziune dermică efectuat, inclusiv rezultatele obținute;
- analiza valorii probante a datelor pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța de testat:

- date de identificare (de exemplu, numărul CAS, sursă, puritate, impurități cunoscute, numărul lotului);
- natura fizică și proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH, volatilitate, solubilitate, stabilitate, reactivitatea cu apă);
- în cazul unui amestec, compoziția și procentajele relative ale componentelor;
- dacă se utilizează anestezic local, identificare, puritate, doză și potențial de interacțiune cu substanța de testat.

Vehicul:

- identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;
- justificarea alegerii vehiculului.

Animale de experiență:

- specie/sușă utilizată, motivație pentru utilizarea altor animale decât iepurele albinos;
- vârsta fiecărui animal la începutul studiului;
- numărul de animale de fiecare sex participante la test și în grupurile de control (dacă este cazul);
- greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului;
- sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.

Rezultate:

- descrierea metodei utilizate pentru punctarea iritației în fiecare moment de observație (de exemplu, lampă portabilă cu fantă, biomicroscop, fluoresceină);

**▼B**

- un tabel cu datele privind reacțiile iritante/corozive la fiecare animal în fiecare moment de observare, până la excluderea din test a fiecărui animal;
- o descriere narativă a gravității și a naturii iritației sau a coroziei observate;
- o descriere a oricăror alte leziuni observate la nivel ocular (de exemplu, vascularizare, formarea unui panus, aderențe, colorare);
- descrierea efectelor adverse locale non-oculare și sistemice și a concluziilor examenului histopatologic, dacă sunt disponibile.

Discutarea rezultatelor.

### 3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Extrapolarea rezultatelor studiilor de iritație oculară asupra animalelor la oameni este valabilă doar într-o măsură restrânsă. În multe cazuri, iepurele albinos este mai sensibil decât oamenii la substanțe cu proprietăți iritante sau corozive la nivel ocular.

La interpretarea datelor se acordă o atenție specială excluderii iritației generate de infecții secundare.

## 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Barratt, M. D., Castell, J. V., Chamberlain, M., Combes, R. D., Dearden, J. C., Fentem, J. H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T. J. B., Livingston, D. J., Provan, W. M., Rutten, F. A. J. J. L., Verhaar, H. J. M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
2. de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K. G., Gerner, I., Schleder, E., Spielmann, H., Gupta, K. C., Hill, R. N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.
3. Worth A. P. and Fentem J. H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177
4. Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.
5. Neun, D. J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
6. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.
- 6a. Metoda de testare B.40. Coroziunea cutanată.
7. Metoda de testare B.4. Toxicitate acută: iritație/coroziune dermică.
8. OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

**▼B**

9. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
10. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

**▼B***Tabelul 1***Punctarea leziunilor oculare****Corneea**

Opacitate: nivel de densitate (examinarea se face în zona cea mai densă) (\*)

|  |   |
|--|---|
| Fără ulcerare sau opacitate .....  | 0 |
| Zone dispersate sau difuze de opacitate (altele decât o ușoară atenuare a strălucirii normale); detaliile irisului clar vizibile ..... | 1 |
| Zonă translucidă ușor perceptibilă; detaliile irisului ușor mascate .....  | 2 |
| Zonă sidefată: detaliile irisului invizibile; dimensiunea pupilei greu perceptibilă .....  | 3 |
| Corneea opacă; iris invizibil din cauza opacității .....   | 4 |

Maximum posibil: 4

(\*) Se notează suprafața cu opacitate corneeană.

**Iris**

|  |   |
|--|---|
| Normal .....   | 0 |
| Pliuri vizibil mai adânci, congestie, tumefiere, hiperhemie pericorneană moderată sau conjunctivă injectată; iris reactiv la lumină (o reacție lentă este considerată a fi un efect) ..... | 1 |
| Hemoragie, distrugere marcată sau absența reacției la lumină .....   | 2 |

Maximum posibil: 2

**Conjunctive**

|   |   |
|---|---|
| Roșeață (se aplică conjunctivelor palpebrală și oculară, exclusiv corneei și irisului) Normal ..... | 0 |
| Hiperhemie evidentă a anumitor vase sanguine (ochi injectați) .....                                 | 1 |
| Colorație purpurie difuză; vasele individuale greu perceptibile .....                               | 2 |
| Colorație roșie susținută difuză .....  | 3 |

Maximum posibil: 3

**Chemosis**

Tumefiere (se referă la pleoape și/sau la membranele nictitante)

|   |   |
|---|---|
| Normal .....  | 0 |
| Tumefiere superioară stării normale .....                     | 1 |
| Tumefiere evidentă, cu eversiunea parțială a pleoapelor ..... | 2 |
| Tumefiere cu pleoape aproape pe jumătate închise .....        | 3 |
| Tumefiere cu pleoape mai mult decât jumătate închise .....    | 4 |

Maximum posibil: 4



## APENDICE

### O strategie de testare secvențială pentru iritația și corозиunea oculară

#### CONSIDERENTE GENERALE

În interesul acurateții științifice și al bunăstării animale, este important să se evite utilizarea inutilă a animalelor de experiență și să se reducă la minimum testările care pot produce reacții grave la animale. Este necesar să se evalueze toate informațiile privind o substanță care sunt relevante pentru potențialul său caracter coroziv/iritant la nivel ocular înainte de luarea în considerare a testării *in vivo*. Este posibil să existe deja date suficiente pentru clasificarea unei substanțe de testat din punctul de vedere al potențialului său coroziv/iritant la nivel ocular, fără a mai fi necesar să se efectueze teste pe animale de laborator. Prin urmare, prin utilizarea unei analize a valorii probante a datelor și a unei strategii de testare secvențiale, se reduce la minimum necesitatea de a efectua teste *in vivo*, în special dacă substanța are potențialul de a produce reacții grave.

Se recomandă utilizarea unei analize a valorii probante a datelor pentru a evalua informațiile existente privind potențialul iritant și coroziv al substanțelor la nivel ocular și a stabili dacă este necesară efectuarea unor studii suplimentare, altele decât studii oculare *in vivo*, pentru caracterizarea acestui potențial. Dacă sunt necesare studii suplimentare, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor experimentale relevante. Pentru substanțele care nu au fost testate anterior, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor necesare pentru evaluarea potențialului său coroziv/iritant la nivel ocular. Strategia de testare descrisă în prezentul apendice a fost dezvoltată în cadrul unui atelier de lucru OCDE (1). Ulterior, ea a fost susținută și extinsă în cadrul Sistemului armonizat integrat de clasificare a riscurilor substanțelor chimice pentru sănătatea oamenilor și mediu (Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adoptat la a 28-a reuniune comună a Comitetului pentru substanțe chimice și a Grupului de lucru pentru substanțe chimice, în noiembrie 1998 (2).

Deși această strategie de testare nu face parte integrantă din metoda de testare B.5, ea reprezintă abordarea recomandată pentru determinarea caracteristicilor iritante/corozive la nivel ocular. Această abordare reprezintă atât cea mai bună practică, cât și un reper etic pentru testarea *in vivo* pentru iritație/corозиune oculară. Metoda de testare oferă indicații pentru efectuarea testului *in vivo* și rezumă factorii care trebuie evaluați înainte de un astfel de test. Strategia de testare secvențială oferă o abordare bazată pe analiza valorii probante a datelor pentru evaluarea datelor existente privind proprietățile iritante/corozive la nivel ocular ale substanțelor și o abordare graduală pentru generarea datelor relevante pentru substanțele pentru care sunt necesare studii suplimentare sau care nu au făcut încă obiectul unor studii. Strategia include, într-o primă etapă, efectuarea unor teste *in vitro* sau *ex vivo* validate și acceptate, iar apoi aplicarea metodei de testare B.4 pentru corозиune/iritație dermică în condiții specifice (3) (4).

#### DESCRIEREA STRATEGIEI DE TESTARE SECVENȚIALE

Înainte de efectuarea testelor incluse în strategia de testare secvențială (figură), se evaluează toate informațiile disponibile pentru a stabili dacă este necesară testarea oculară *in vivo*. Deși se pot obține informații semnificative din evaluarea unor parametri specifici (de exemplu, o valoare extremă a pH-ului), se iau în considerare toate informațiile existente. Se evaluează toate datele relevante privind efectele substanței în cauză și a analogilor săi pentru adoptarea unei decizii prin analiza valorii probante a datelor și se prezintă motivele care stau la baza deciziei. Se acordă o atenție specială datelor privind efectele substanței asupra oamenilor și animalelor, apoi rezultatelor testelor *in vitro* sau *ex vivo*. Se evită, ori de câte ori este posibil, efectuarea unor studii *in vivo* pentru substanțele corozive. Factorii luați în considerare în strategia de testare includ:

## ▼B

*Evaluarea datelor privind efectele asupra oamenilor și animalelor (Etapa 1).* Se iau în primul rând în considerare datele existente privind efectele asupra oamenilor, de exemplu studii clinice și ocupaționale sau studii de caz, și/sau date obținute în cadrul unor studii oculare asupra animalelor, deoarece acestea furnizează informații direct legate de efectele asupra ochilor. Apoi, se evaluează datele disponibile din studii de coroziune/iritație dermică asupra oamenilor și/sau animalelor. Nu se instilează în ochii animalelor substanțele având un caracter coroziv sau un potențial iritant sever cunoscut la nivel ocular sau substanțele care prezintă efecte corozive sau iritante la nivel dermic; acestea din urmă sunt considerate a fi corozive și/sau iritante și la nivel ocular. Nu este necesar să se efectueze studii *in vivo* nici asupra substanțelor pentru care există date suficiente, obținute din studii oculare anterioare, că nu sunt corozive sau iritante.

*Analiza relațiilor structură-activitate (RSA) (Etapa 2).* Se iau în considerare rezultatele testelor asupra substanțelor înrudite din punct de vedere structural, dacă sunt disponibile. Dacă sunt disponibile suficiente date privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor ale unor substanțe înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe care indică un potențial coroziv/iritant la nivel ocular, se poate presupune că substanța în curs de evaluare va produce aceleași reacții. În astfel de cazuri, este posibil să nu fie necesare teste asupra substanței în cauză. Datele negative obținute de studiile asupra substanțelor înrudite structural sau asupra amestecurilor de astfel de substanțe nu constituie dovezi suficiente pentru caracterul necoroziv/neiritant al substanței supuse strategiei de testare secvențiale. Se utilizează abordări RSA validate și acceptate pentru a identifica potențialul coroziv și iritant atât la nivel dermic, cât și ocular.

*Proprietățile fizico-chimice și reactivitatea chimică (Etapa 3).* Substanțele care prezintă valori extreme ale pH-ului,  $\leq 2,0$  sau  $\geq 11,5$  pot produce efecte locale puternice. Dacă valorile extreme ale pH-ului constituie baza pentru identificarea unei substanțe ca fiind corozivă sau iritantă la nivel ocular, atunci se poate lua în considerare și rezerva sa acidă/alcalină (sau capacitatea de tamponare) (5) (6). În cazul în care capacitatea de tamponare sugerează că este posibil ca substanța să nu fie corozivă la nivel ocular, se efectuează teste suplimentare pentru confirmare, de preferat prin utilizarea unui test *in vitro* sau *ex vivo* validat și acceptat (a se vedea etapele 5 și 6 din această secțiune).

*Analiza altor informații existente (Etapa 4).* În această etapă se evaluează toate informațiile disponibile privind toxicitatea sistemică prin absorbție cutanată. Se ia, de asemenea, în considerare toxicitatea dermică acută a substanței. Dacă substanța de testat s-a dovedit foarte toxică prin absorbție cutanată, este posibil să nu fie necesare teste oculare. Deși nu există obligatoriu o relație între toxicitate dermică acută și iritația/coroziunea oculară, se poate presupune că un agent foarte toxic prin absorbție cutanată va prezenta o toxicitate ridicată la instilarea în ochi. Astfel de date pot fi analizate, de asemenea, între etapele 2 și 3.

*Rezultatele testelor in vitro sau ex vivo (Etapale 5 și 6).* Substanțele care au prezentat proprietăți corozive sau puternic iritante într-un test *in vitro* sau *ex vivo* (7) (8) validat și acceptat pentru evaluarea specifică a coroziei/iritației la nivel dermic sau ocular, nu trebuie să fie testate pe animale. Se poate presupune că substanțele în cauză vor produce efecte similare grave *in vivo*. Dacă nu sunt disponibile teste *in vitro/ex vivo* validate și acceptate, se trece peste etapele 5 și 6 și se continuă direct cu etapa 7.

*Evaluarea caracterului iritant sau coroziv la nivel dermic al substanței in vivo (Etapa 7).* În cazul în care nu există informații suficiente pentru analiza valorii probante a datelor privind potențialul iritant/coroziv la nivel ocular al unei substanțe pe baza studiilor enumerate anterior, se evaluează mai întâi potențialul iritant/coroziv la nivel dermic, utilizând metoda de testare B.4 (4) și apendicele său (9). Dacă se observă că substanța produce coroziune sau iritație puternică la nivel dermic, ea este considerată a fi, de asemenea, corozivă sau iritantă la nivel ocular, cu excepția cazului în care informațiile disponibile conduc la o concluzie diferită. Astfel, nu este necesar să se efectueze un test ocular *in vivo*. Dacă substanța nu este corozivă sau puternic iritantă la nivel dermic, se efectuează un test ocular *in vivo*.

**▼B**

*Testul in vivo pe iepuri (Etapale 8 și 9).* Testul ocular *in vivo* începe cu un test inițial efectuat pe un singur animal. Dacă rezultatele acestui test indică că substanța este puternic iritantă sau corozivă la nivel ocular, nu se efectuează teste suplimentare. Dacă testul nu relevă efecte corozive sau puternic iritante, se efectuează un test de confirmare pe alte două animale.

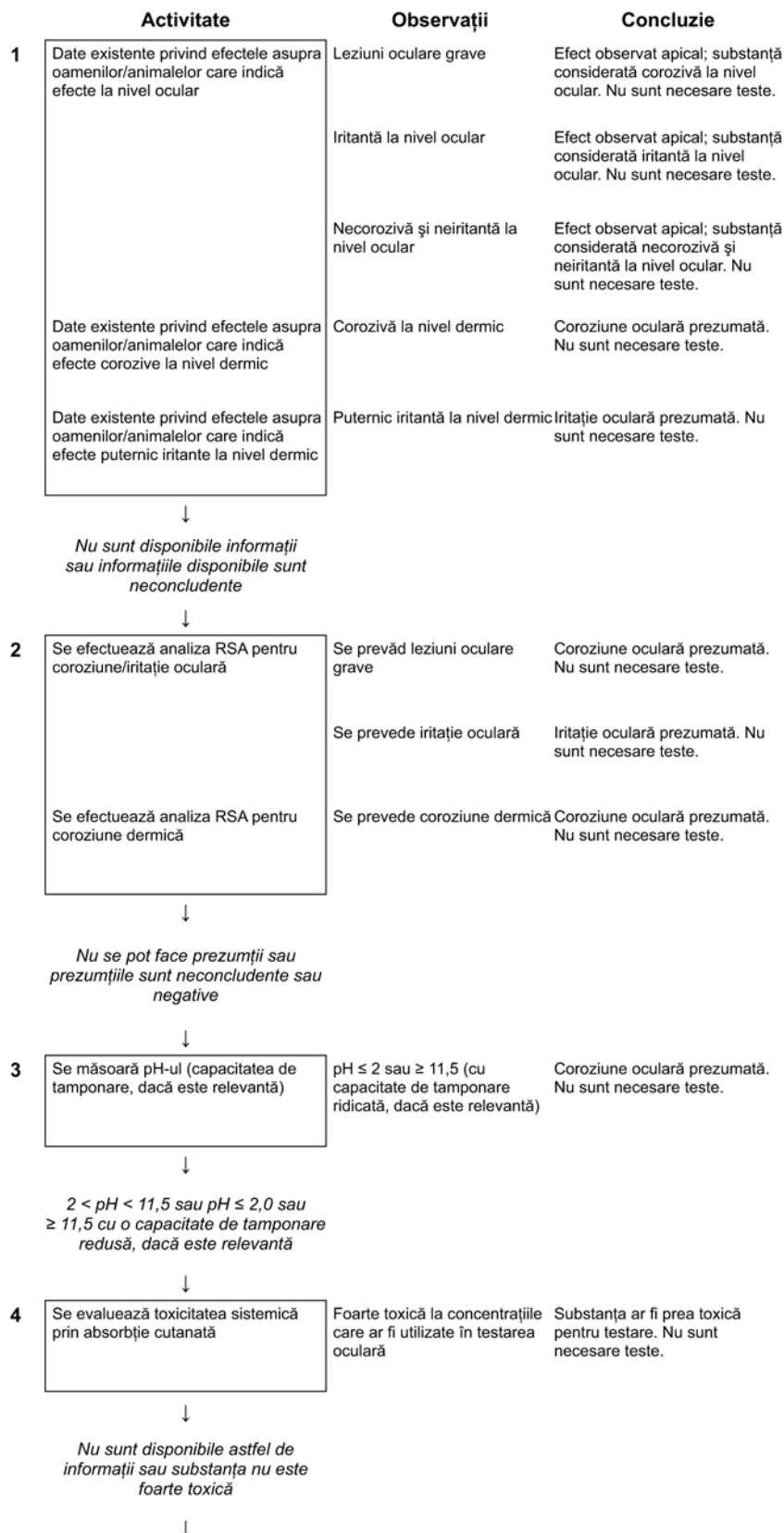
**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
2. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
3. Worth, A. P. and Fentem J. H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
4. Metoda de testare B.4. Toxicitate acută: iritație/coroziune dermică.
5. Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.
6. Neun, D. J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
7. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.
8. Metoda de testare B.40 Coroziunea cutanată.
9. Apendicele la metoda de testare B.4: O strategie de testare secvențială pentru iritație și coroziiune dermică.

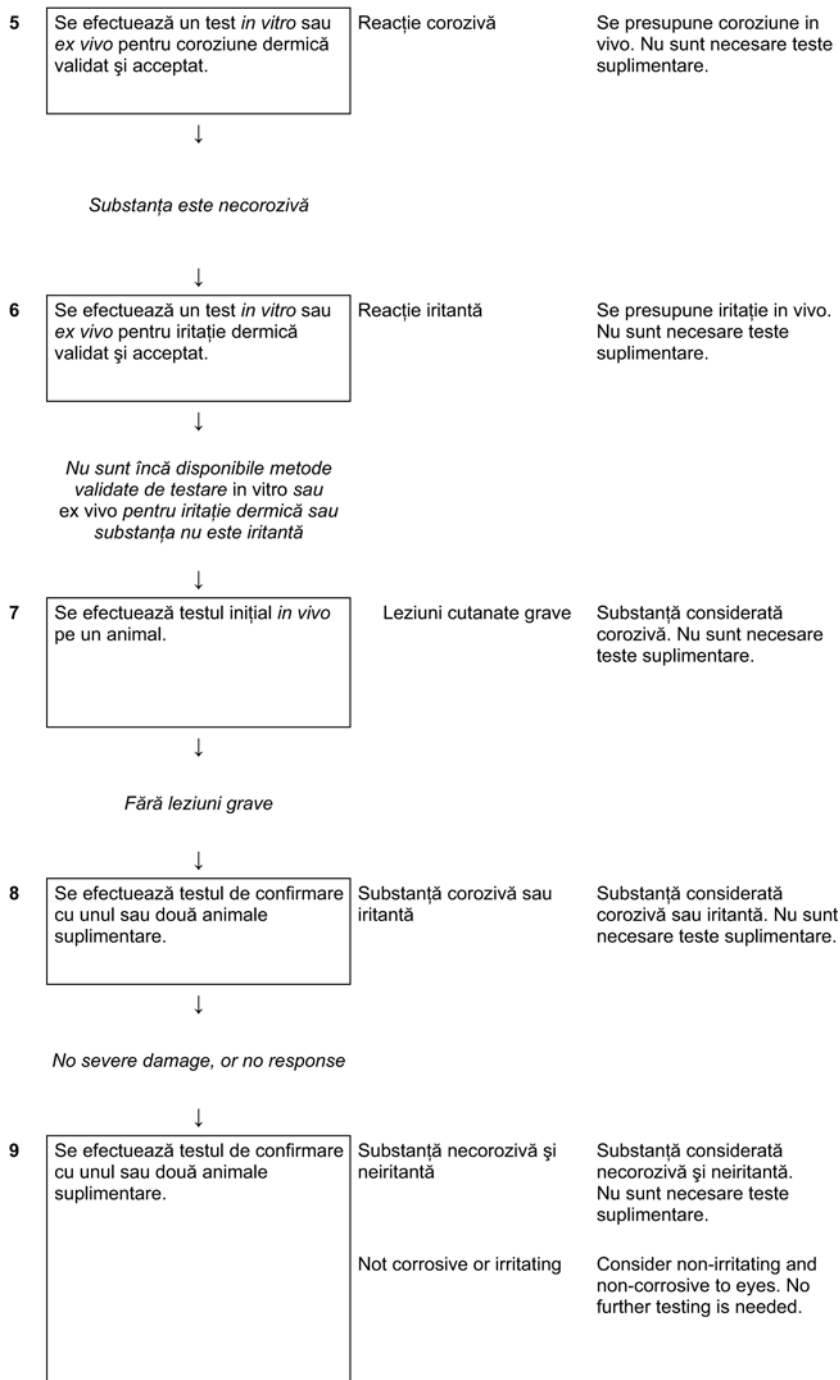


Figură

## Strategie de testare și evaluare a iritației/coroziunii oculare





▼ B

**▼B****B.6. SENSIBILIZARE CUTANATĂ****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE***Observații*

Sensibilitatea și capacitatea testelor de a detecta substanțele capabile să provoace o sensibilizare cutanată la om reprezintă criterii importante în sistemul de clasificare a toxicității din motive de sănătate publică.

Nu există o metodă de testare unică care să permită identificarea adecvată a tuturor substanțelor cu un potențial de sensibilizare cutanată la om și care să fie aplicabilă tuturor substanțelor.

Diversi factori, cum ar fi proprietățile fizice ale unei substanțe, inclusiv capacitatea sa de a penetra pielea, trebuie luați în considerare atunci când se alege metoda de testare.

Au fost dezvoltate două tipuri de teste la care se folosesc cobai: pe de o parte, testele cu adjuvant la care starea alergică este potențializată prin dizolvarea sau suspendarea substanței testate în adjuvantul complet Freund (ADF) și fără adjuvant, pe de altă parte.

Testele cu folosirea adjuvantului au o capacitate mai bună de evidențiere a potențialului de sensibilizare cutanată a substanței testate și o mai mare precizie decât testele care nu utilizează adjuvantul complet Freund.

Testul de maximizare la cobai (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) este un test cu adjuvant foarte răspândit. Cu toate că există mai multe metode pentru detectarea potențialului de sensibilizare cutanată, testul GPMT este testul cu adjuvant folosit cu predilecție.

Testele fără adjuvant (testul Buehler este de preferat) sunt considerate a fi mai puțin sensibile în ceea ce privește numeroase clase de produse chimice.

În unele cazuri există motive întemeiate în vederea alegerii testului Buehler, care constă într-o aplicare topică, pe când testul de maximizare necesită o injecție intradermică. Utilizarea testului Buehler trebuie justificată din punct de vedere științific.

Testul de maximizare la cobai GPMT și testul Buehler sunt descrise în cadrul acestei metode. Se pot folosi și alte metode, cu condiția ca ele să fi fost validate în mod corespunzător, iar utilizarea lor să fie argumentată din punct de vedere științific.

Dacă se obține un rezultat pozitiv în cadrul unui test de depistare recunoscut, substanța poate fi considerată ca potențial sensibilizantă și se poate să nu mai fie necesară efectuarea unui test suplimentar pe cobai. Cu toate acestea, dacă s-a obținut un test negativ într-un asemenea test, trebuie efectuat un test pe cobai, utilizându-se procedura descrisă la prezenta metodă de testare.

A se vedea și introducerea generală, partea B.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

Sensibilizarea cutanată (dermatita alergică de contact) reprezintă o reacție imunologică cutanată la o substanță. La om, reacția se poate caracteriza prin apariția pruritului, a unui eritem, al unui edem, a unor vezicule sau papule sau prin asocierea acestor manifestări. La alte specii, reacția poate fi diferită și se poate manifesta doar sub forma unor eriteme sau edeme.

*Expunere de inducție:* expunere experimentală a unui subiect la o substanță cu scopul de a provoca o hipersensibilitate.

*Perioadă de inducție:* o perioadă de cel puțin o săptămână după expunerea de inducție, în cursul căreia poate apărea o stare de hipersensibilitate.

*Expunere de declanșare:* expunere experimentală, după o perioadă de inducție, a unui subiect expus în prealabil substanței respective, cu scopul de a verifica dacă subiectul va avea o reacție hipersensitivă.

## 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Sensibilitatea și fiabilitatea tehnicii de testare utilizate trebuie să fie verificate din șase în șase luni, cu ajutorul unor substanțe care au proprietăți cunoscute de sensibilizare cutanată de la slab la moderat.

La testele efectuate în mod corect, substanțele cu proprietăți sensibilizante slabe sau moderate provoacă în mod normal o reacție la cel puțin 30 % dintre animale, la metodele cu adjuvant și la 15 % dintre ele, la metodele fără adjuvant.

Se vor utiliza, de preferință, următoarele substanțe.

| Număr CAS | Număr EINECS | Denumire EINECS                           | Denumire uzuală              |
|-----------|--------------|---|------------------------------|
| 101-86-0  | 202-983-3    | $\alpha$ -hexilcinamaldehydă              | $\alpha$ -hexilcinamaldehydă |
| 149-30-4  | 205-736-8    | benzotiazol-2-tiol (mercaptoben-zotiazol) | kaptax                       |
| 94-09-7   | 202-303-5    | benzocaină                                | nordcaină                    |

În unele cazuri justificate în mod suficient, se pot folosi și alte substanțe martor, care să răspundă criteriilor de mai sus.

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Inițial animalele de experiență sunt expuse substanței testate printr-o injecție intradermică și/sau prin aplicare epidermică (expunere de inducție). După o perioadă de odihnă de la 10 la 14 zile (perioada de inducție) în cursul căreia se poate produce o reacție imunitară, animalele sunt supuse unei doze de declanșare. Suprafața și intensitatea reacției cutanate a animalelor se compară cu cele ale animalelor martor cărora li s-a administrat placebo cu ocazia inducerii și care au fost supuse expunerii de declanșare.

## 1.5. DESCRIEREA METODELOR DE TESTARE

Dacă se dovedește necesară eliminarea substanței testate, acest lucru se va face utilizându-se apă sau un solvent adecvat, astfel încât să nu se modifice reacția existentă sau integritatea epidermei.

**▼B**1.5.1. *Testul de maximizare la cobai (GMPT)*

## 1.5.1.1. Pregătirea testului

Exemplare tinere de cobai albi, în stare bună de sănătate, se aclimatizează în condițiile de laborator, cel puțin cu cinci zile înainte de începerea testului. Înainte de începerea testului, animalele sunt distribuite aleator în grupuri care urmează a fi tratate și loturi martor. Blana va fi tunsă, rasă sau epilată chimic, în funcție de metoda utilizată. Pielea animalelor nu trebuie să fie jupuită. Animalele sunt cântărite, atât înainte de începerea testului, precum și după încheierea acestuia.

## 1.5.1.2. Condiții de testare

## 1.5.1.2.1. Animalele de experiență

Linii pure de cobai albi folosite în mod curent în laboratoare.

## 1.5.1.2.2. Număr și sex

Se vor folosi animale de același sex, indiferent care este acesta. Dacă se vor folosi femele, acestea trebuie să fie nulipare și nu trebuie să fie însărcinate.

Se vor folosi minimum 10 animale în grupul tratat și cel puțin 5 în lotul martor. Dacă grupul tratat constă din mai puțin de 20 de animale, iar lotul martor din mai puțin de 10 și dacă în urma testului nu s-a putut concluda că substanța testată este o substanță sensibilizantă, se recomandă utilizarea și a altor animale pentru a se ajunge la un număr total de cel puțin 20 de animale de experiență și 10 martor.

## 1.5.1.2.3. Doze

Concentrația de substanță administrată la expunerea de inducție trebuie să fie bine tolerată de organismul animalelor și trebuie să corespundă concentrației maxime care provoacă o iritație cutanată ușoară și moderată. Concentrația folosită pentru expunerea de declanșare trebuie să corespundă concentrației maxime care nu provoacă nicio iritație. Dacă este necesar, concentrațiile adecvate pot fi determinate pe baza unui test-pilot pe două sau pe trei animale. În acest scop, se vor utiliza animale tratate cu adjuvantul complet Freund.

## 1.5.1.3. Procedură

## 1.5.1.3.1. Inducerea

Ziua 0 – grupul tratat

Trei serii de injecții intradermice de un volum de câte 0,1 ml fiecare se vor administra în regiunea scapulară de unde a fost îndepărtată blana, în prealabil, de o parte și de cealaltă a liniei mediane.

Injecția 1: amestec 1:1 (v/v) adjuvant complet Freund/apă sau ser fiziologic

Injecția 2: substanța testată într-un vehicul adecvat la concentrația aleasă

Injecția 3: substanța de testat la concentrația dorită, amestec 1:1 (v/v) cu adjuvantul complet Freund sau cu ser fiziologic

La injecția 3, substanțele solubile în apă sunt dizolvate în faza apoasă înainte de a fi amestecate cu adjuvantul complet Freund sau cu serul fiziologic. Substanțele liposolubile sau insolubile sunt mai întâi suspendate în adjuvantul complet Freund și mai apoi în faza apoasă. Concentrația finală a substanței testate trebuie să fie egală cu cea utilizată la injecția 2.

**▼B**

Injectiile 1 și 2 sunt administrate aproape una de cealaltă și cât mai aproape de cap, iar injectia 3 va fi administrată spre partea caudală a zonei de testare.

Ziua 0 – lotul martor

Trei serii de câte două injecții intradermice cu un volum de câte 0,1 ml fiecare se vor administra în aceeași regiune ca la animalele tratate.

Injectia 1: amestec 1:1 (v/v) adjuvant complet Freund/apă sau ser fiziologic

Injectia 2: vehiculul nediluat

Injectia 3: formulă de 50 % a vehiculului într-un amestec 1:1 (v/v) adjuvantul complet Freund/apă sau cu ser fiziologic

Ziua 5-7 – grupul tratat, lotul martor

Aproximativ cu 24 de ore înainte de aplicarea topică de inducție și în cazul în care substanța nu a provocat iritații cutanate, zona de testare rasă și/sau tunsă va fi tratată cu 0,5 ml de sulfat de lauril de sodiu în concentrație de 10 % în vaselină, astfel încât să se provoace o iritație locală.

Ziua 6-8 – grupul tratat

De pe zona de testare se îndepărtează din nou blana. O bucată de hârtie de filtru (2 × 4 cm) îmbibată cu substanța testată și cu vehiculul adecvat se aplică pe zona de testare și se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament oclisiv, timp de 48 de ore. Alegerea vehiculului trebuie justificată. Substanțele solide sunt pulverizate și incorporate într-un vehicul adecvat; eventual, substanțele lichide pot fi aplicate direct.

Ziua 6-8 – lotul martor

De pe zona de testare se îndepărtează din nou blana. Se aplică doar vehiculul pe zona de testare, după indicațiile de mai sus și se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament oclisiv, timp de 48 de ore.

#### 1.5.1.3.2. Declanșare

Ziua 20-22 – grupul tratat și lotul martor

Se îndepărtează blana de pe șoldurile animalelor tratate și de pe șoldurile animalelor martor. Un platură sau o capsulă îmbibate cu substanța testată se aplică pe unul dintre șoldurile animalelor și dacă este necesar, un platură sau o capsulă îmbibate doar cu vehicul se aplică pe celălalt șold. Platurile se vor menține în contact cu pielea timp de 24 de ore cu ajutorul unui pansament oclisiv.

Examinare și cotare: grupul tratat și lotul martor

- la aproximativ 21 de ore după înlăturarea platurii, zona de testare se curăță și se rade și/sau se tunde și se epilează dacă este necesar;
- aproximativ 3 ore mai târziu (aproximativ la 48 de ore după începutul aplicării dozei de declanșare), reacția cutanată este examinată și cotată pe baza scalei indicate în apendice;
- aproximativ 24 de ore după această examinare, urmează o nouă perioadă de examinare (la 72 ore) și o nouă cotare.

Se recomandă o citire oarbă a animalelor din ambele grupuri.

Dacă este necesară precizarea rezultatelor obținute cu ocazia primei expuneri de declanșare, o a doua expunere în vederea declanșării unei reacții (și anume o redeclanșare), eventual cu un alt lot martor, poate fi avută în vedere, aproximativ cu o săptămână după prima expunere. Noua expunere în vederea declanșării unei reacții se poate efectua, de asemenea, pe lotul martor inițial.

**▼B**

Toate observațiile și toate reacțiile cutanate, inclusiv cele sistemice, ca urmare a unei expuneri de inducție sau de declanșare trebuie examinate și cotate pe baza scalei Magnusson/Kligman (a se vedea apendicele). Alte tehnici, cum ar fi examinarea histopatologică sau măsurarea pliului cutanat, pot fi folosite la descrierea unor reacții îndoielnice.

1.5.2. *Testul Buehler*

## 1.5.2.1. Pregătirea testului

Exemplare tinere de cobai albinoși, în stare bună de sănătate, sunt lăsați să se aclimatizeze la condițiile de laborator cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului. Înainte de începerea testului, animalele sunt distribuite aleator în grupuri care urmează a fi tratate și grupuri martor. Blana va fi tunsă, rasă sau epilată chimic, în funcție de metoda utilizată. Pielea animalelor nu trebuie să fie jupuită. Animalele sunt cântărite atât înainte de începerea testului, precum și după încheierea acestuia.

## 1.5.2.2. Condiții de testare

## 1.5.2.2.1. Animalele de experiență

Linii pure de cobai albinos folosite în mod curent în laboratoare.

## 1.5.2.2.2. Număr și sex

Se vor folosi animale de același sex, indiferent care este acesta. Dacă se vor folosi femele, acestea trebuie să fie nulipare și nu trebuie să fie însărcinate.

Se vor folosi minimum 20 animale în grupul tratat și cel puțin 10 în lotul martor.

## 1.5.2.2.3. Doze

Concentrația de substanță administrată la expunerea de inducție trebuie să corespundă concentrației maxime care provoacă o iritație cutanată moderată, dar nu exagerată. Concentrația folosită pentru expunerea de declanșare trebuie să corespundă concentrației maxime care nu provoacă nicio iritație. Dacă este necesar, concentrațiile potrivite pot fi determinate pe baza unui test-pilot pe două sau pe trei animale.

La substanțele hidrosolubile se va folosi apa ca vehicul sau o soluție diluată neiritantă de surfactant. La celelalte substanțe, se va utiliza de preferință un amestec de etanol de 80 % în apă, la inducere și de acetonă la declanșare.

## 1.5.2.3. Procedură

## 1.5.2.3.1. Inducerea

Ziua 0 – grupul tratat

Se îndepărtează blana de pe unul din șoldurile animalelor. Compresa care va servi la efectuarea testului se îmbibă cu substanța testată, incorporată într-un vehicul adecvat (alegerea vehiculului trebuie justificată; dacă este necesar, substanțele lichide pot fi aplicate în mod direct).

Compresa se aplică pe zona de testare și se menține în contact cu pielea timp de 6 ore cu ajutorul unui plastru oclisiv sau al unei capsule și al unui pansament potrivit.

**▼B**

Sistemul trebuie să fie oclisiv. Un tampon de vată circular sau pătrat de 4-6 cm<sup>2</sup> este potrivit. Se va utiliza de preferință un dispozitiv de asigurare a etanșeității plasturelui pentru a asigura caracterul oclisiv. Dacă au fost folosite pansamente, o expunere suplimentară poate fi necesară.

Ziua 0 – lotul martor

Se îndepărtează blana de pe unul din șoldurile animalelor. Se aplică doar vehiculul pe zona de testare, după indicațiile de mai sus, la animalele tratate. Compresa care servește la realizarea testului se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui plasture oclisiv sau al unei capsule și al unui pansament potrivit. Dacă se poate demonstra faptul că simularea tratamentului pe lotul martor nu este necesară, această etapă poate fi omisă, utilizându-se un lot martor căruia nu i se administrează nimic.

Zilele 6-8 și 13-15 – grupul tratat și lotul martor

Același tratament ca cel descris pentru ziua 0 se aplică pe aceeași zonă de testare (de unde se îndepărtează blana, dacă acest lucru este necesar), pe același șold, în ziua 6-8 și din nou în ziua 13-15.

#### 1.5.2.3.2. Declanșare

Ziua 27-29 – grupul tratat și lotul martor

Se îndepărtează blana de pe șoldurile netratate ale animalelor tratate și ale animalelor martor. Un plasture oclisiv sau o capsulă care conține cantitatea adecvată din substanța testată, la concentrația maximă care nu provoacă nicio iritație, se aplică pe partea posterioară a șoldului netratat al animalelor din grupul tratat și din cel martor.

Dacă este necesar, se aplică și un plasture oclisiv sau o capsulă care nu conține decât vehiculul, pe partea anterioară a șoldului netratat al animalelor din ambele grupuri. Plasturele sau capsulele se vor menține în contact cu pielea timp de 6 de ore, cu ajutorul unui pansament potrivit.

#### 1.5.2.3.3. Examinare și cotare

— la aproximativ 21 de ore după înlăturarea plasturelui, de pe zona de testare se îndepărtează blana;

— cu aproximativ 3 ore mai târziu (aproximativ 30 de ore după începutul aplicării dozei de declanșare), reacția cutanată este examinată și cotată pe baza scalei indicate în apendice;

— la aproximativ 24 de ore după această examinare (aproximativ 54 de ore după aplicarea dozei de declanșare), reacția cutanată este din nou examinată și cotată.

Se recomandă o citire oarbă a reacțiilor, atât în grupul tratat, precum și în lotul martor.

Dacă este necesară precizarea rezultatelor obținute cu ocazia primei expuneri de declanșare, o a doua expunere în vederea declanșării unei reacții, eventual cu un alt lot martor, poate fi avută în vedere, aproximativ cu o săptămână după prima expunere. Noua expunere în vederea declanșării unei reacții se poate efectua, de asemenea, pe primul lot martor.

**▼B**

Toate reacțiile cutanate și toate reacțiile neobișnuite, inclusiv reacțiile sistemice, ca urmare a unei expuneri de inducție sau de declanșare (de redeclanșare) trebuie înregistrate și cotate pe baza scalei Magnusson/Kligman (a se vedea apendicele). Alte tehnici, cum ar fi examinarea histopatologică sau măsurarea pliului cutanat, pot fi folosite la descrierea unor reacții îndoielnice.

2. **DATE (GMPT și testul Buehler)**

Rezultatele sunt sintetizate și incluse într-un tabel care va indica reacțiile cutanate la fiecare animal, pentru fiecare examinare.

3. **RAPORT (GMPT și testul Buehler)**

Dacă înainte de testul efectuat pe cobai s-a efectuat și un test de depistare [de exemplu, testul de umflare a urechilor la șoareci (MEST)], trebuie furnizate descrierile sau referințele acestora, precum și detaliile modului de operare și rezultatele obținute cu substanța testată și cu substanța de referință.

**Raportul de testare (GMPT sau testul Buehler)**

Raportul de testare va conține, în măsura posibilităților, următoarele informații:

Animale de experiență:

- specia/linia pură;
- numărul animalelor, vârsta, sexul;
- originea, condiții de adăpostire, regim alimentar etc.;
- greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

- tehnici de preparare a zonei de testare;
- detalii asupra materialelor folosite pentru aplicarea substanței și tehnica aplicării plasturelui;
- rezultatele testului-pilot și concluziile privind concentrațiile de inducție și de declanșare care trebuie utilizate în cadrul testului;
- detalii privind prepararea, aplicarea și eliminarea substanței testate;
- justificarea alegerii vehiculului;
- concentrații ale vehiculului și ale substanței testate utilizate pentru expunerile de inducție și de declanșare, cantitatea totală a substanței aplicate în vederea inducerii și a declanșării.

Rezultate:

- sintetizarea rezultatelor ultimului control de sensibilitate și de fiabilitate (a se vedea 1.3), inclusiv informații cu privire la substanță, la concentrația acesteia și la vehiculul utilizat;



**▼B**

- toate examinările efectuate pe fiecare animal, inclusiv cotările;
- descrierea naturii și a gravității efectelor observate;
- toate examinările histopatologice.

Evaluarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 406 a OCDE.

**▼B***Apendice**TABEL***Scala de cotare Magnusson/Kligman pentru evaluarea reacțiilor declanșate  
pe locul aplicării plasturilor**

0 = niciun semn vizibil

1 = eritem discret sau neomogen

2 = eritem moderat și confluent

3 = eritem cu inflamație masivă

## ▼M4

**B.7. STUDIU DE 28 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 407 (2008) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 407 a fost adoptată în 1981. În 1995 s-a adoptat o versiune revizuită, pentru a obține informații suplimentare de la animalele folosite în cadrul studiului, în special în ceea ce privește neurotoxicitatea și toxicitatea imunologică.
2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor privind testele și de elaborare a noilor orientări pentru depistarea și testarea unor factori perturbatori potențiali ai sistemului endocrin (8). Un element al activității a fost actualizarea orientării OCDE pentru „studiul de 28 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la rozătoare” (Orientarea 407) prin parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice testate. Această procedură a fost supusă unui amplu program internațional de testare a relevanței și fezabilității parametrilor suplimentari, performanțele acestor parametri pentru substanțe cu activitate (anti)estrogenică, (anti)androgenică și (anti)tiroidiană, reproductibilitatea intra- și interlaboratoare și interferența noilor parametri cu cei impuși de Orientarea 407 precedentă. Cantitatea mare de date obținute astfel a fost compilată și evaluată în detaliu într-un raport OCDE cuprinzător (9). Această metodă de testare actualizată B.7 (echivalentă cu Orientarea 407) este rezultatul experienței și rezultatelor obținute în cursul programului de testare internațional. Această metodă de testare permite plasarea unor efecte endocrine mediate în context cu alte efecte toxicologice.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE**

3. La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unei substanțe, determinarea toxicității orale folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale privind toxicitatea din teste de toxicitate acută. Această metodă de testare este destinată investigării efectelor asupra unei varietăți foarte largi de ținte potențiale ale toxicității. Studiul furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate ce pot fi antrenate de expunerea repetată pe o perioadă relativ limitată, inclusiv efecte asupra sistemului nervos, sistemului imunitar și celui endocrin. Referitor la aceste efecte particulare, studiul are în vedere identificarea substanțelor chimice cu potențial neurotoxic, care ar putea justifica investigarea mai aprofundată a acestui aspect și a substanțelor chimice care afectează fiziologia tiroidei. De asemenea, el poate furniza date privind substanțele care afectează organele reproductive ale masculilor și/sau femelelor la animalele adulte tinere și poate oferi o indicație privind efectele imunologice.
4. Rezultatele acestei metode de testare B.7 sunt folosite pentru identificarea pericolelor și evaluarea riscurilor. Rezultatele obținute din parametrii endocriini conecși sunt evaluate în contextul din „Cadru conceptual OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine” (11). Metoda cuprinde studiul de bază de toxicitate la doză repetată, care se poate folosi pentru substanțe chimice pentru care nu este justificat un studiu de 90 de zile (de exemplu, în cazul în care volumul producției nu depășește anumite limite) sau ca preliminar pentru un studiu pe termen lung. Durata de expunere este de 28 de zile.

▼ **M4**

5. Programul internațional desfășurat la validarea parametrilor corespunzători pentru posibila detectare a activității endocrine a unei substanțe chimice testate a arătat că experiența laboratorului de testare influențează mult calitatea datelor obținute prin această metodă de testare B.7. Acest lucru se referă în mod specific la determinarea histopatologică a modificărilor ciclice ale organelor reproductive ale femelelor și la determinarea greutateii organelor mici dependente de hormoni, care sunt dificil de disecat. S-a elaborat un ghid privind examenul histopatologic (19). El este disponibil pe site-ul internet public al OCDE privind orientările pentru testare. Ghidul este conceput pentru a fi util medicilor patologi în examinările lor și contribuie la creșterea sensibilității testului. S-a constatat că o varietate de parametri indică toxicitatea pentru sistemul endocrin și aceștia au fost incluși în metoda de testare. Parametrii pentru care au fost disponibile date insuficiente pentru a demonstra utilitatea sau care au prezentat, în cadrul programului de validare, doar indicii slabe privind capacitatea lor de a contribui la detectarea perturbatorilor endocrini sunt propuși ca puncte finale opționale (a se vedea apendicele 2).
6. Pe baza datelor generate în cadrul procesului de validare, trebuie subliniat faptul că sensibilitatea acestui test nu este suficientă pentru identificarea tuturor substanțelor cu moduri de acțiune (anti)androgenice sau (anti)estrogenice (9). Metoda de testare nu se aplică într-o etapă de viață foarte sensibilă la perturbarea endocrină. Cu toate acestea, metoda de testare a identificat, în cursul procesului de validare, substanțe care afectează în mică sau mare măsură funcția tiroidei și substanțe cu acțiune endocrină puternică și moderată, care acționează prin intermediul receptorilor estrogenici sau androgenici dar, în majoritatea cazurilor, nu a reușit să identifice substanțele cu activitate endocrină care afectează ușor receptorii estrogenici sau androgenici. Astfel, metoda nu poate fi descrisă ca un test de screening pentru activitatea endocrină.
7. În consecință, lipsa efectelor legate de aceste moduri de acțiune nu se poate considera o dovadă a lipsei de efecte asupra sistemului endocrin. În ceea ce privește efectele endocrine mediate, caracterizarea substanței nu trebuie să se bazeze doar pe rezultatele acestei metode de testare, ci trebuie să fie folosite într-o abordare bazată pe forța probantă a datelor, integrând toate datele existente referitoare la o substanță chimică, pentru a caracteriza posibila activitate endocrină. Din acest motiv, luarea unei decizii de reglementare privind activitatea endocrină (caracterizarea substanței) trebuie să constituie o abordare cu bază largă, care nu se bazează doar pe rezultatele aplicării acestei metode de testare.
8. Se recunoaște faptul că toate procedurile bazate pe animale vor fi conforme cu standardele locale privind îngrijirea animalelor; descrierile referitoare la îngrijire și tratament prezentate mai jos reprezintă standarde de performanțe minime și vor fi înlocuite de regulamentele locale, dacă acestea sunt mai stricte. OCDE pune la dispoziție orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor (14).
9. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

10. Substanța chimică testată se administrează zilnic, pe cale orală, în doze graduale, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 28 de zile. Pe perioada administrării, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea detectării eventualelor semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în cursul testului se supun unei autopsii, iar la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate animalele care au supraviețuit. Un studiu de 28 de zile

▼ **M4**

furnizează informații privind efectele expunerii. De asemenea, studiul poate furniza informații privind selectarea concentrațiilor pentru studiile pe termen mai lung. Datele obținute prin utilizarea metodei de testare permit caracterizarea toxicității substanței chimice testate, pentru indicarea relației doză-răspuns și determinarea nivelului la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL).

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

11. Testele se efectuează, de preferință, pe șobolani, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În cazul în care parametrii specificați în cadrul acestei metode de testare B.7 sunt investigați pe alte specii de rozătoare, trebuie să se prezinte o justificare detaliată. Deși din punct de vedere biologic este plauzibil ca alte specii să răspundă la substanțele toxice într-o manieră similară cu șobolanul, utilizarea unor specii mai mici poate conduce la o variabilitate crescută din cauza dificultăților de disecție a unor organe mici. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea factorilor perturbatori ai sistemului endocrin, șobolanul a fost singura specie folosită. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. Administrarea începe cât mai curând posibil după înțarcare și, în orice caz, înainte de vârsta de nouă săptămâni. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite trebuie să fie minime și să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie pentru fiecare sex. Atunci când se efectuează un studiu prin administrare orală repetată înaintea unui studiu mai lung, se recomandă folosirea animalelor din aceeași sușă și origine în ambele studii.

**Adăpostire și hrănire**

12. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de laborator se asigură o temperatură de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Deși umiditatea relativă este de minimum  $30\%$  și, de preferință, nu trebuie să depășească  $70\%$ , cu excepția momentelor în care se curăță spațiul, obiectivul este de  $50\text{--}60\%$ . Iluminatul este artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate în cazul administrării prin această metodă. Animalele sunt adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu se va depăși numărul de cinci animale pe fiecare cușcă.
13. Hrana se analizează regulat în vederea identificării contaminanților. O probă din regimul alimentar se păstrează până la finalizarea raportului.

**Pregătirea animalelor**

14. Animale adulte, tinere, sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile trebuie să fie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Animalele sunt identificate individual și ținute în cuștile lor timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

**Pregătirea dozelor**

15. Substanța chimică testată se administrează prin gavaj sau prin regimul alimentar ori apa potabilă. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico/chimice/toxico-cinetice ale substanței chimice testate.

▼ **M4**

16. Dacă este necesar, substanța testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. În cazul în care vehiculul utilizat nu este apă, trebuie să fie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale acestuia. Trebuie să se determine stabilitatea substanței chimice testate în vehicul.

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

17. Se vor folosi minimum 10 animale (5 femele și 5 masculi) pentru fiecare doză. Dacă se prevede eutanasierea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total înainte de finalizarea studiului. În plus, se poate lua în considerare un grup satelit de 10 animale (5 din fiecare sex) în grupul martor și în grupul cu doză maximă, pentru observații vizând reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul a minimum 14 zile după tratament.

**Dozare**

18. Ca regulă generală, trebuie să existe cel puțin trei grupuri de testare și un grup martor, dar dacă din evaluarea altor date nu se anticipează niciun efect la administrarea repetată a unei doze de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, se poate realiza un test la valori-limită. Atunci când nu există date adecvate disponibile, se poate realiza un studiu de stabilire a intervalului (animale din aceeași sușă și sursă), pentru a contribui la determinarea dozelor de administrat. Exceptând tratamentul cu substanța chimică testată, animalele din grupul martor se tratează în mod identic cu animalele din grupul testat. Dacă pentru administrarea substanței chimice testate se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.
19. Nivelurile de dozare sunt selecționate ținându-se cont de toate datele disponibile privind toxicitatea și aspectele (toxico-)cinetice referitoare la substanța chimică testată sau la substanțele înrudite. Doza cea mai ridicată trebuie să fie aleasă astfel încât să producă efecte toxice care să nu ducă însă la moarte sau la suferințe intense. Se va alege mai apoi o serie de doze descrescătoare, pentru a se evidenția relația dintre răspuns și doză administrată și nivelul dozei la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și deseori este de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.
20. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra indicațiilor de rezultat sensibile de tip imunitar, neurologic sau endocrin trebuie să fie interpretate cu precauție.

**Testul la valori-limită**

21. Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării prin regimul alimentar sau prin apă potabilă, la o concentrație echivalentă (în funcție de greutatea corporală) nu produce efecte toxice detectabile și atunci când nu se anticipează toxicitatea pe baza informațiilor despre substanțe cu structuri asemănătoare, poate să nu fie considerată necesară efectuarea unui studiu complet cu trei niveluri de dozare. Testul la valori-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

▼ **M4****Administrarea dozelor**

22. Substanța chimică testată va fi administrată animalelor timp de 7 zile pe săptămână, pe o perioadă de 28 de zile. Când substanța chimică testată se administrează prin gavaj, ea se administrează animalelor în doză unică, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive care produc, de obicei, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului administrat trebuie să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.
23. În cazul administrării substanțelor chimice prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. Dacă substanța chimică testată se administrează prin intermediul regimului alimentar, există două alternative: fie sub forma unei concentrații constante în alimentație (ppm), fie sub forma unei doze constante în raport cu greutatea corporală a animalului; trebuie să se specifice alternativa folosită. Atunci când substanța chimică se administrează prin gavaj, administrarea dozei trebuie să se facă zilnic aproximativ la aceeași oră și să fie ajustată după în funcție de necesități, pentru a menține un nivel constant al dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când se efectuează un studiu cu doză repetată înainte de un studiu pe lungă durată, regimul alimentar trebuie să fie similar în ambele cazuri.

**Observații**

24. Perioada de observație durează 28 de zile. Animalele dintr-un grup satelit, prevăzută pentru examinări suplimentare, sunt ținute sub observație, fără tratament, timp de cel puțin încă 14 zile, astfel încât să se poată detecta eventualele apariții întârziate ale efectelor toxice, persistența lor sau recuperarea de pe urma efectelor toxice.
25. Observațiile clinice generale sunt efectuate cel puțin o dată pe zi, de preferință în același moment (sau aceleași momente) ale zilei, în funcție de perioada de după încheierea administrării în care efectele sunt mai pronunțate. Se consemnează starea de sănătate a animalelor. Toate animalele sunt examinate cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.
26. Toate animalele sunt supuse unei observații clinice detaliate înainte primei expuneri (astfel încât mai târziu să se poată face comparații între diferitele stări de sănătate la același individ) și cel puțin o dată pe săptămână în perioada următoare. Aceste examinări sunt efectuate în afara cuștii în care sunt găzduite animalele, într-o incintă standard și, de preferință, de fiecare dată în același moment al zilei. Ele se consemnează cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Variabilitatea condițiilor de laborator este redusă la minim, iar examinările se fac, de preferință, de către persoane care nu sunt informate asupra tratamentului. Examinările vor avea în vedere, între altele, modificări ale pielii, blânii, ochilor, mucoaselor, secrețiilor și excrețiilor, precum și activitatea autonomă (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilelor, respirație neobișnuită). Sunt consemnate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și răspuns la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi) (2).
27. În cursul celei de-a patra săptămâni de expunere, se evaluează răspunsul la diferiți stimuli (2) (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (3) (4) (5), forța de prehensiune (6) și activitatea locomotoare (7). Detalii suplimentare referitoare la procedurile utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Se pot folosi însă și alte proceduri decât cele din referințele bibliografice.

▼ **M4**

28. Observațiile funcționale din a patra săptămână de expunere pot fi omise dacă studiul este efectuat înaintea unui studiu subcronic (de 90 de zile). În acest caz, observațiile funcționale trebuie să facă parte din studiul complementar. În schimb, dacă există informații pe baza unor observații funcționale efectuate în cadrul unor studii anterioare prin administrare repetată, acest lucru poate facilita alegerea dozelor la studiul subcronic ulterior.
29. În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupurile care prezintă simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar interfera semnificativ cu desfășurarea testului funcțional.
30. La autopsie se poate determina (opțional) ciclul estral al tuturor femelelor, prin prelevarea de frotiuri vaginale. Aceste observații vor furniza informații privind stadiul ciclului estral la momentul sacrificiului și vor fi utile la evaluarea histologică a țesuturilor sensibile la estrogen [a se vedea ghidul privind examenul histopatologic (19)].

**Greutatea corporală și consumul de hrană și apă**

31. Toate animalele trebuie să fie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa potabilă, se măsoară cel puțin săptămânal și consumul de apă.

**Examenul hematologic**

32. Următoarele examinări hematologice trebuie să fie efectuate la sfârșitul perioadei de testare: hematocritul, concentrațiile de hemoglobină, numărul de eritrocite, reticulocitele, numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare. Printre alte determinări efectuate în cazul în care substanța chimică testată sau eventualii săi metaboliți au sau se presupune că au proprietăți oxidante se numără concentrația de methemoglobină și corpii Heinz.
33. Probele de sânge trebuie să fie prelevate într-un punct determinat, chiar înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în timpul acesteia și se conservă în condiții adecvate. Animalele nu primesc hrană în noaptea dinainte de eutanasiere <sup>(1)</sup>.

**Biochimia clinică**

34. Trebuie să se efectueze măsurări biochimice clinice în vederea cercetării principalelor efecte toxice asupra țesuturilor, în special asupra ficatului și asupra rinichilor, pe baza unor probe de sânge prelevate de la toate animalele chiar înainte sau în timpul procedurii de eutanasiere (cu excepția animalelor muribunde sau eutanasiate înainte de încheierea studiului). Determinările efectuate în plasmă sau ser vor include nivelurile de sodiu, potasiu, glucoză, colesterol total, uree, creatinină, proteine totale și albumină, nivelurile a cel puțin două enzime care indică efectele hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gama glutamil transpeptidaza și sorbitol dehidrogenaza), precum și acizii biliari. În unele cazuri, determinările altor enzime (de origine hepatică sau diferită) și a bilirubinei pot furniza informații utile.
35. Opțional, în cursul ultimei săptămâni a studiului se pot efectua următoarele analize de urină, cu colectarea într-un interval de timp a unui volum de urină: aspect, volum, osmolalitate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

<sup>(1)</sup> Pentru o serie de măsurători în ser și plasmă, în special pentru glucoză, se recomandă absența hranei peste noapte. Motivul principal pentru această preferință este că variabilitatea crescută care ar rezulta inevitabil în cazul administrării hranei peste noapte ar putea masca efecte mai subtile și ar face interpretarea mai dificilă. În schimb, privarea de hrană în timpul nopții poate afecta metabolismul general al animalelor și, în special în studiile privind hrănirea, poate să perturbe expunerea zilnică la substanța chimică testată. În cazul în care probele sunt prelevate după o perioadă de privare de hrană, determinările biochimice trebuie să fie efectuate după examinările funcționale din săptămâna a patra a studiului.



## ▼ M4

36. În plus, trebuie avute în vedere studii pentru investigarea indicatorilor plasmatici sau serici ai leziunilor generale ale ţesuturilor. Alte determinări care ar putea fi necesare în cazul în care proprietăţile substanţei chimice testate pot sau sunt susceptibile să modifice profilurile metabolice, includ calciul, fosfaţii, trigliceridele, hormonii specifici şi colinesteraza. Acestea trebuie să fie identificate pentru substanţele chimice din anumite clase sau de la caz la caz.

37. Deşi în cadrul evaluării internaţionale a efectelor endocrine conexe nu s-a putut demonstra un avantaj clar pentru determinarea hormonilor tiroidieni (T3, T4) şi TSH, poate fi necesar să se păstreze probe de plasmă sau ser pentru măsurarea T3, T4 şi TSH (opţional) în cazul în care există o indicaţie a unui efect asupra axei hipofiză-tiroidă. Aceste probe pot fi congelate la -20 °C pentru păstrare. Următorii factori pot influenţa variabilitatea şi concentraţiile absolute la determinarea hormonale:

- momentul eutanasierii, din cauza variaţiei diurne a concentraţiilor hormonale;
- metoda de eutanasiere pentru a evita stresul excesiv al animalelor, care poate afecta concentraţiile hormonale;
- seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot diferi prin curbele standard.

Identificarea definitivă a substanţei cu activitate asupra tiroidei este mai credibilă pe baza analizei histopatologice decât pe baza determinării nivelurilor hormonale.

38. Probele de plasmă destinate în mod specific determinării hormonale trebuie să fie prelevate la momente comparabile din zi. Se recomandă să se ia în considerare determinarea valorilor T3, T4 şi TSH iniţiate pe baza modificărilor în histopatologia tiroidei. Valorile numerice obţinute la analiza concentraţiilor hormonale diferă în funcţie de diferitele seturi de testare comerciale. În consecinţă, se poate ca furnizarea criteriilor de performanţă să nu fie posibilă pe baza unor date istorice uniforme. Ca alternativă, laboratoarele trebuie să încerce menţinerea coeficienţilor de control al variaţiei sub 25 pentru T3 şi T4 şi sub 35 pentru TSH. Toate concentraţiile se consemnează în ng/ml.

39. Dacă informaţiile de bază colectate anterior nu sunt adecvate, trebuie luată în considerare determinarea parametrilor hematologici şi biochimici înaintea începerii administrării sau, de preferinţă, pe un grup de animale neincluse în grupurile experimentale.

## PATOLOGIA

### Autopsia

40. Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete şi detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeţei externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităţilor craniană, toracică şi abdominală, precum şi a conţinutului acestora. *Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, prostata + veziculele seminale şi glandele coagulante în ansamblu, timusul, splina, creierul şi inima* tuturor animalelor (cu excepţia celor muribunde şi/sau a celor eutanasiate înaintea încheierii studiului) sunt curăţate de ţesuturile aderente, după caz, şi cântărite în stare proaspătă după disecţie, pentru a evita deshidratarea. Se procedează cu atenţie la curăţarea ansamblului prostatei, pentru a evita perforarea veziculelor seminale care conţin fluid. Ca alternativă, veziculele seminale şi prostata pot fi curăţate şi cântărite după fixare.

## ▼ M4

41. În plus, opțional se pot cântări alte două țesuturi, cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea: perechea de ovare (greutate în stare umedă) și uterul, inclusiv colul uterin [îndrumări privind îndepărtarea și prepararea țesuturilor uterine pentru determinarea greutateii sunt puse la dispoziție în Orientarea 440 a OCDE (18)].
42. După fixare se poate determina (opțional) greutatea tiroidei. Curățarea se face foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor poate compromite analiza histopatologică.
43. Țesuturile următoare trebuie să fie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut (a se vedea punctul 47): *toate țesuturile care prezintă leziuni macroscopice, encefalul* (regiuni reprezentative: creierul mare, cerebelul și puntea), *măduva spinării, ochiul, stomacul, intestinul subțire, intestinul gros* (inclusiv plăcile Peyer), *ficatul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, timusul, tiroida, traheea și plămânii* (conservați prin umflare cu fixativ și imersie ulterioară), *gonadele* (testiculele și ovarele), *organele genitale anexe* (de exemplu, uterul și colul, epididimul, prostata + veziculele seminale cu glandele coagulante), *vaginul, vezica urinară, ganglionii limfatici* [în afară de cel mai apropiat ganglion de drenare, se prelevează încă un ganglion limfatic, conform experienței laboratorului (15)], *nervul periferic* (sciatic sau tibial), de preferință foarte aproape de mușchi, *mușchi scheletici și os cu măduvă osoasă* (secțiune sau, ca alternativă, aspirat de măduvă osoasă proaspăt fixat pe lamă). Se recomandă fixarea testiculelor prin imersie în fixator Bouin sau Davidson modificat (16) (17). Tunica albuginea trebuie perforată cu un ac, cu atenție și la adâncime mică, la ambii poli ai organului, pentru a permite penetrarea rapidă a fixatorului. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate organe-țintă probabile pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.
44. Următoarele țesuturi pot furniza indicații valoroase privind efectele asupra sistemului endocrin: gonadele (ovarele și testiculele), organele sexuale anexe (uterul, inclusiv colul uterin, epididimul, veziculele seminale cu glandele coagulante, prostata dorso-laterală și ventrală), vaginul, hipofiza, glanda mamară masculină, tiroida și glanda suprarenală. Modificările glandelor mamare masculine nu au fost suficient documentate dar acest parametru poate fi foarte sensibil la substanțe cu acțiune estrogenică. Observarea organelor/țesuturilor neenumerate la punctul 43 este opțională (a se vedea appendicele 2).
45. Ghidul privind examenul histopatologic (19) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și examenul histopatologic al țesuturilor endocrine.
46. În programul internațional de testare s-au obținut dovezi în sensul că se pot identifica efecte endocrine subtile ale unor substanțe cu capacitate redusă de afectare a homeostaziei hormonale, prin perturbarea sincronizării ciclului estral în diferite țesuturi și mai puțin prin alterări histopatologice clare ale organelor sexuale feminine. Deși nu s-a obținut vreo dovadă concludentă privind asemenea efecte, se recomandă să se ia în considerare dovezile unor posibile desincronizări ale ciclului estral la interpretarea examenului histopatologic al ovarelor (celule foliculare, tecale și granulare), uterului, colului uterin și vaginului. În cazul în care este evaluat stadiul ciclului determinat prin frotiuri vaginale poate fi inclus de asemenea în această comparație.

**▼ M4****Examenul histopatologic**

47. Se efectuează un examen histopatologic complet al ţesuturilor şi organelor conservate ale tuturor animalelor aparţinând grupului martor şi grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene sunt extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.
48. Se examinează toate leziunile macroscopice.
49. Atunci când se foloseşte un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al ţesuturilor şi organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

**DATE ŞI RAPORT****Date**

50. Rezultatele sunt indicate pentru fiecare animal în parte. În plus, toate datele sunt rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de testare numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau eutanasiate din motive umane şi momentul morţii sau al eutanasierii, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate observate, în special momentul apariţiei acestora, durata şi severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor şi procentul animalelor care prezintă fiecare tip de leziune.
51. Dacă este posibil, rezultatele numerice se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate şi general acceptate. Pentru comparaţiile efectelor pe un interval de dozare se evită recurgerea la teste t multiple. Metodele statistice se aleg în faza de concepere a studiului.
52. Pentru controlul calităţii, se propune colectarea datelor martor anterioare şi calculul coeficienţilor de variaţie pentru datele numerice, în special pentru parametrii în legătură cu detectarea unui factor perturbator al proceselor endocrine. Aceste date se pot folosi în scop comparativ la evaluarea studiilor curente.

**Raportul de testare**

53. Raportul de testare trebuie să conţină următoarele date:

*Substanţa chimică testată:*

- natura fizică, puritatea şi proprietăţile fizico-chimice;
- date de identificare.

*Vehiculul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

*Animalele testate:*

- specia/suşa utilizată;
- numărul, vârsta şi sexul animalelor;
- sursa, condiţiile de adăpost, regimul alimentar etc.
- greutatea fiecărui animal la începutului testului.
- justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât şobolanul.

*Condiţiile de testare:*

- justificarea alegerii nivelului dozei administrate;
- detalii privind formula substanţei chimice testate/prepararea hranei, concentraţia obţinută, stabilitatea şi omogenitatea preparatului;

**▼ M4**

- detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice testate;
- conversia concentrației substanței chimice testate (ppm) în hrană/apă potabilă la doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

*Efecte opționale investigate*

- lista efectelor opționale investigate.

*Rezultate:*

- greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;
- consumul de hrană și apă, dacă este cazul;
- rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și niveluri ale dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;
- natura, gravitatea și durata semnelor clinice (reversibile sau nu);
- evaluările activității senzoriale, a forței de prehensiune și a activității locomotorii;
- examenele hematologice și valorile de referință corespunzătoare;
- examenele de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;
- greutatea corporală în momentul eutanasierii animalului și date privind greutatea organelor;
- concluziile autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;
- date referitoare la absorbție, dacă este cazul;
- tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul.

*Evaluarea rezultatelor**Concluzii*

▼ **M4***Apendicele 1***DEFINIȚII**

**Androgenicitatea** este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

**Antiandrogenicitatea** este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

**Antiestrogenicitatea** este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17β) în organismul unui mamifer.

**Activitatea antitiroidiană** este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T<sub>3</sub>) în organismul unui mamifer.

**Dozarea** este un termen general care desemnează doza administrată, frecvența și durata administrării.

**Doza** este cantitatea de substanță chimică testată administrată. Doza este exprimată ca greutatea substanței chimice testate pe unitatea de greutate a animalului testat (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

**Toxicitatea evidentă** este un termen general care descrie simptome clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice testate. Aceste manifestări trebuie să fie suficient de pronunțate pentru a permite o evaluare a riscurilor și să se poată anticipa că o mărire a dozei administrate poate declanșa apariția unor simptome de toxicitate severe și probabil moartea.

**NOAEL** este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai înalt nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse în legătură cu tratamentul.

**Estrogenicitatea** este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17β) în organismul unui mamifer.

**Substanță chimică testată:** orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

**Activitatea tiroidiană** este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T<sub>3</sub>) în organismul unui mamifer.

**Validarea** este un proces științific conceput pentru caracterizarea cerințelor operaționale și limitărilor unei metode de testare și pentru demonstrarea credibilității sale și relevanței pentru un anumit scop.

▼ **M4***Apendicele 2***Indicatori de rezultat recomandați pentru detectarea perturbatorilor endocrini (EDs) în această metodă de testare B.7**

| Indicatori de rezultat obligatorii                       | Indicatori de rezultat opționali     |
|--|--------------------------------------|
| Greutate   |                                      |
| — Testicule  | — Ovary                              |
| — Epididim   | — Uter, inclusiv colul uterin        |
| — Glande suprarenale                                     | — Tiroidă                            |
| — Prostată + veziculele seminale cu glandele coagulante  |                                      |
| Examen histopatologic                                    |                                      |
| — Gonade:  | — Frotiuri vaginale                  |
| — testicule; și  | — Glande mamare masculine            |
| — ovare  | — Hipofiză                           |
| — Organe sexuale anexe:                                  |                                      |
| — epididim;  |                                      |
| — prostată + veziculele seminale cu glandele coagulante; |                                      |
| — uter, inclusiv colul uterin                            |                                      |
| — Glande suprarenale                                     |                                      |
| — Tiroidă  |                                      |
| — Vagin  |                                      |
| Determinări hormonale                                    |                                      |
|  | — Nivelurile circulatorii ale T3, T4 |
|  | — Nivelurile circulatorii ale TSH    |

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) OECD (Paris, 1992), Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60
- (3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (4) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691-704.
- (5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.

▼ **M4**

- (7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (8) OECD (1998), Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD (2006), Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.
- (10) OECD (2002), Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012), Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. [http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr\\_2649\\_37407\\_2348794\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html).
- (12) OECD (2006), Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OECD, Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OECD (2000), Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D., Walter G. (2005), STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 33: 404-407.
- (16) Hess R.A., Moore B.J. (1993), Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin R.E. and Heindel J.J. (eds.), Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (17) Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002), Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (18) OECD (2007), OECD Guideline for Testing of Chemicals N° 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009), Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼ **M4****B.8. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 28 DE ZILE****REZUMAT**

Această metodă de testare revizuită B.8 a fost concepută pentru caracterizarea completă a toxicității substanței chimice testate prin calea de inhalare în urma expunerii repetate pe o perioadă limitată (28 de zile) și pentru a furniza date pentru evaluările cantitative ale riscului prin inhalare. Grupuri de minim 5 masculi și 5 femele de rozătoare sunt expuse 6 ore pe zi timp de 28 zile la a) substanța chimică testată la trei sau mai multe niveluri de concentrație; b) aer filtrat (grup martor negativ); și/sau c) vehicul (grup martor vehicul). În general, animalele sunt expuse 5 zile pe săptămână, dar este permisă și expunerea timp de 7 zile pe săptămână. Masculii și femelele se testează întotdeauna, dar pot fi supuși unor niveluri de concentrație diferite dacă se cunoaște faptul că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată. Această metodă permite conducătorului studiului flexibilitatea de a include grupuri satelit (de reversibilitate), lavajul bronhoalveolar (BAL), teste neurologice și evaluări suplimentare clinice patologice și histopatologice, pentru caracterizarea mai bună a toxicității unei substanțe chimice testate.

**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 412 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 412 privind inhalarea subacută a fost adoptată în 1981 (1). Această metodă de testare B.8 (ca echivalent la varianta revizuită a Orientării 412) a fost actualizată pentru a reflecta nivelul științific și pentru a satisface cerințele de reglementare curente și viitoare.
2. Această metodă permite caracterizarea efectelor adverse în urma expunerii repetate zilnice prin inhalarea substanței chimice testate timp de 28 de zile. Datele obținute din studiile de 28 de zile de toxicitate subacută se pot folosi pentru evaluări cantitative ale riscului [în cazul în care studiul nu este urmat de un studiu de 90 de zile de toxicitate subcronică prin inhalare (capitolul B.29 din prezenta anexă)]. De asemenea, datele pot furniza informații privind selectarea concentrațiilor pentru studiile pe termen mai lung, de exemplu un studiu de 90 de zile de toxicitate subcronică prin inhalare. Această metodă nu este destinată în mod specific testării nanomaterialelor. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul 39 (2).

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

3. Toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată trebuie luate în considerare de laboratorul de testare înainte de efectuarea studiului, în vederea îmbunătățirii calității studiului și minimizării utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate concentrații de testare corespunzătoare includ: identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele tuturor testelor de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; și date rezultate din testarea toxicității acute prin inhalare. În cazul în care în decursul studiului se anticipează sau se observă neurotoxicitatea, conducătorul studiului poate alege să includă și evaluări adecvate, de exemplu un set de observații funcționale (FOB) și măsurarea activității motorii. Deși momentele expunerii în funcție de examinările specifice pot fi critice, desfășurarea acestor activități suplimentare nu trebuie să afecteze protocolul studiului de bază.



▼ **M4**

4. Diluțiile substanțelor corozive sau iritante testate se pot testa la concentrații care generează gradul dorit de toxicitate [a se vedea Ghidul 39 (2)]. La expunerea animalelor la aceste materiale, concentrațiile vizate trebuie să fie suficient de reduse pentru a nu induce durere sau suferință accentuată, dar totuși suficiente pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt selectate de la caz la caz, de preferință pe baza unui studiu de stabilire a dozelor conceput corespunzător, care furnizează informații privind efectul critic, pragul de iritare și momentul apariției (a se vedea punctele 11-13). Se prezintă justificarea pentru selecția concentrației.
5. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită trebuie să fie eutanasiate. Animalele muribunde sunt considerate în același mod ca animalele care mor în cursul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau expuse unor suferințe intense și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unui ghid separat OCDE privind efectele asupra omului (3).

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

6. Se utilizează rozătoare adulte, tinere, sănătoase, provenite din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul. Dacă se utilizează alte specii, decizia trebuie să fie motivată.

**Pregătirea animalelor**

7. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua randomizării, animalele trebuie să fie adulți tineri în vârstă de 7 până la 9 săptămâni. Greutățile corporale trebuie să se încadreze în intervalul de  $\pm 20\%$  față de greutatea medie pentru fiecare sex. Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

**Îngrijirea animalelor**

8. Dacă este posibil, animalele sunt identificate individual, cu transpondere subcutanate, pentru a facilita observarea și a evita confuziile. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă este menținută, în mod ideal, în intervalul de 30 până la 70 %, deși, acest lucru poate să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri animalele sunt închise în cuști în grupuri, în funcție de sex și concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele sunt expuse doar în zona nasului, ar putea fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau de imobilizare. Imobilizarea poate afecta efecte fiziologice cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator pe minut. În cazul în care sunt disponibile date generice care demonstrează că nu se produc asemenea modificări într-o măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea preliminară la tuburile de imobilizare. Animalele la care întregul corp este expus corp unui aerosol sunt ținute în cuști individuale în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare de laborator, convenționale și certificate, cu excepția perioadei de expunere, iar apa de băut din rețeaua municipală este furnizată în cantitate nelimitată. Iluminatul este artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

▼ **M4****Incintele de inhalare**

9. Natura substanței chimice testate și obiectivul testului sunt luate în considerare la selectarea unei incinte de inhalare. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). În general, expunerea doar în zona nasului este preferată pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere prin intermediul întregului corp, dar această metodă trebuie să fie justificată în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, „volumul” total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor particulare sunt descrise în Ghidul 39 (2).

**STUDII DE TOXICITATE****Concentrații-limită**

10. Spre deosebire de studiile de toxicitate acută, în studiile de 28 de zile de toxicitate subacută prin inhalare nu se definesc limite de concentrație. Concentrația testată maximă trebuie să țină seama de: 1. concentrația maximă realizabilă; 2. nivelul de expunere umană în „cele mai nefavorabile condiții”; 3. necesitatea de a menține un aport adecvat de oxigen; și/sau 4. considerații privind bunăstarea animalelor. În absența unor limite bazate pe date, se pot utiliza limitele acute din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (13) (până la o concentrație maximă de 5 mg/l pentru aerosoli, 20 mg/l pentru vapori și 20 000 ppm pentru gaze); a se vedea Ghidul 39 (2). În cazul în care este necesară depășirea acestor limite la testarea gazelor sau substanțelor de testare foarte volatile (de exemplu, agenți frigorifici), trebuie să se prezinte justificarea. Concentrația-limită trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce un stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

**Studiul de stabilire a intervalului**

11. Înainte de a începe studiul principal, poate fi necesar să se efectueze un studiu de stabilire a intervalului. Un astfel de studiu este mai cuprinzător decât un studiu de observare, deoarece nu se limitează la alegerea concentrației. Cunoștințele dobândite în urma unui studiu de stabilire a intervalului pot conduce la un studiu principal reușit. Un studiu de stabilire a intervalului poate, de exemplu, să furnizeze informații tehnice privind metodele analitice, granulometria, descoperirea mecanismelor toxice, date de patologie clinică și histopatologice și estimări asupra posibilelor concentrații NOAEL și MTC în studiul principal. Conducătorul studiului poate alege să folosească studiul de stabilire a intervalului pentru identificarea pragului de iritație a căilor respiratorii (de exemplu, cu examenul histopatologic al căilor respiratorii, testarea funcției pulmonare sau lavaj bronhoalveolar), a concentrației superioare care este tolerată fără stres excesiv pentru animale și a parametrilor care vor caracteriza cel mai bine toxicitatea unei substanțe chimice testate.
12. Un studiu de stabilire a intervalului poate consta în unul sau mai multe niveluri de concentrație. Nu se vor expune mai mult de trei masculi și trei femele la fiecare nivel de concentrație. Un studiu de stabilire a intervalului durează minimum 5 zile și, în general, nu mai mult de 14 zile. Justificarea alegerii concentrațiilor pentru studiul principal trebuie să fie specificată în raportul de studiu. Obiectivul studiului principal este să demonstreze relația concentrație-răspuns pe baza efectului anticipat ca fiind cel mai sensibil. În mod ideal, concentrația inferioară este o concentrație fără efect advers observabil, iar concentrația superioară trebuie să determine toxicitatea neechivocă fără a induce stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

**▼ M4**

13. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de stabilire a intervalului, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv relațiile structură-activitate și date pentru substanțe chimice similare (a se vedea punctul 3). Un studiu de stabilire a intervalului poate confirma/infirma efectele considerate a fi cele mai sensibile din punct de vedere al mecanismului, de exemplu inhibarea colinesterazei de către fosfați organici, formarea metemoglobinei de către agenți toxici pentru eritrocite, hormonii tiroidieni (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) pentru agenții toxici față de tiroidă, proteinele, LDH sau neutrofilele în lavajul bronhoalveolar pentru particule puțin solubile nedăunătoare sau aerosoli iritanți pentru plămâni.

**Studiul principal**

14. Studiul principal de toxicitate subacută constă, în general, în trei niveluri de concentrație și grupuri martor negative (cu aer) și/sau cu vehicul studiate în paralel, după cum este necesar (a se vedea punctul 17). Trebuie să se utilizeze toate datele disponibile, pentru a contribui la selectarea nivelurilor de expunere adecvate, inclusiv rezultatele studiilor de toxicitate sistemică, metabolism și cinetică (trebuie să se acorde o atenție specială evitării nivelurilor ridicate de concentrație care saturează procesele cinetice). Fiecare grup testat conține cel puțin 10 rozătoare (5 masculi și 5 femele) expuse la substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 5 zile pe săptămână, pe o perioadă de 4 săptămâni (durata totală a studiului de 28 de zile). Animalele pot fi expuse și 7 zile pe săptămână (de exemplu, la testarea produselor farmaceutice inhalate). În cazul în care se știe că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată, sexele pot fi expuse la niveluri diferite de concentrație, pentru optimizarea răspunsului la concentrație, așa cum se arată la punctul 15. Dacă alte specii de rozătoare sunt expuse doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. Trebuie să se prezinte o justificare la utilizarea unei durate de expunere sub 6 ore/zi sau în cazul în care este necesar un studiu de lungă durată (de exemplu 22 de ore/zi) cu expunerea întregului corp [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Alimentarea se sistează în perioada expunerii, în afară de cazul în care expunerea depășește 6 ore. La expunerea prin intermediul întregului corp se poate asigura apa.

15. Concentrațiile-țintă selectate identifică organele-țintă și demonstrează o relație clară concentrație-răspuns:

- nivelul de concentrație ridicat trebuie să inducă efecte toxice dar să nu determine simptome persistente sau mortalitate, ceea ce ar preveni o evaluare semnificativă;
- nivelurile de concentrație intermediare sunt administrate eșalonat, astfel încât efectele toxice să fie graduale între concentrația redusă și cea ridicată;
- nivelul de concentrație redusă trebuie să producă o toxicitate redusă sau să nu producă semne de toxicitate.

**Studiul satelit (de reversibilitate)**

16. Un studiu satelit (de reversibilitate) se poate folosi pentru a observa reversibilitatea, persistența sau apariția cu întârziere a toxicității pentru o perioadă post-tratament de lungime adecvată, dar nu mai mare de 14 zile. Grupurile satelit (de reversibilitate) constau în cinci masculi și cinci femele expuse în paralel cu animalele experimentale din studiul principal. Grupurile din studiile satelit (de reversibilitate) sunt expuse la substanța chimică testată la nivelul maxim de concentrație și trebuie să existe grupuri martor cu aer și/sau vehicul, după caz, studiate în paralel (a se vedea punctul 17).

▼ **M4****Animalele din grupul martor**

17. Animalele din grupul martor negativ (cu aer) studiat în paralel se manipulează într-o manieră identică cu cele din grupul de testare, cu excepția faptului că sunt expuse la aer filtrat în locul substanței chimice testate. În cazul în care se folosește apa sau altă substanță pentru generarea atmosferei de testare, se include în studiu un grup martor pentru vehicul, în locul grupului martor negativ (cu aer). Când este posibil, se folosește apa ca vehicul. Când se folosește apa ca vehicul, animalele din grupul martor se expun la aer cu aceeași umiditate relativă ca și grupurile expuse. Alegerea unui vehicul adecvat se bazează pe un studiu preliminar corespunzător sau pe date anterioare. În cazul în care nu se cunoaște bine toxicitatea unui vehicul, conducătorul studiului poate alege să folosească atât un grup martor negativ (cu aer) cât și un grup martor pentru vehicul, dar se recomandă categoric evitarea acestei abordări. În cazul în care datele anterioare arată că vehiculul nu este toxic, nu este necesar un grup martor negativ (cu aer) și se folosește doar un grup martor pentru vehicul. În cazul în care un studiu preliminar al unei substanțe chimice testate formulate într-un vehicul nu prezintă nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată și se va utiliza acest grup martor pentru vehicul.

**CONDIȚII DE EXPUNERE****Administrarea concentrațiilor**

18. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația aleasă și/sau forma fizică cu cea mai probabilitate de prezență în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele higroscopice și reactive din punct de vedere chimic sunt testate în condiții de aer uscat. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita generarea concentrațiilor explozive. Materialele sub formă de particule pot fi supuse unor procese mecanice pentru reducerea dimensiunii particulelor. Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).

**Distribuția granulometrică**

19. Granulometria se efectuează pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametrul aerodinamic median masiv al particulelor (DAMM) de la 1 la 3  $\mu\text{m}$ , cu o abatere standard geometrică ( $\sigma_g$ ) în intervalul 1,5-3,0 (4). Trebuie depus un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, dar în cazul în care acest lucru nu este realizabil, trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele de vapori metalici pot fi mai mici decât acest standard iar particulele cu sarcină electrică și fibrele pot fi mai mari.

**Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul**

20. În mod ideal, substanța chimică testată se testează fără vehicul. În cazul în care este necesar să se folosească un vehicul pentru a genera o concentrație și o granulometrie corespunzătoare pentru substanța chimică testată, se preferă apa. Întotdeauna când o substanță chimică testată este dizolvată într-un vehicul, trebuie să se demonstreze stabilitatea sa.

**MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE****Debitul de aer în incintă**

21. Debitul de aer vehiculat prin incinta de expunere este controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea în timp real a concentrației (sau stabilității în timp a) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc de control indirect al parametrilor dinamici relevanți pentru inhalare. În cazul în care concentrația este monitorizată în

▼ **M4**

timp real, frecvența măsurătorii debitelor de aer se poate reduce la o singură măsurătoare pe zi pentru fiecare expunere. Trebuie să se acorde o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte pentru expunere doar în zona nasului. Concentrația de oxigen este de minimum 19 % iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se poate atinge acest standard, se măsoară concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon. În cazul în care măsurătorile în prima zi de expunere arată că aceste gaze se află la niveluri corespunzătoare, nu mai sunt necesare alte măsurători.

**Temperatura și umiditatea relativă în incintă**

22. Temperatura incintei trebuie să fie menținută la  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor, pentru expunerea în zona nasului și a întregului corp, trebuie să fie monitorizată și înregistrată orar în timpul fiecărei expuneri, dacă este posibil. Este preferabil ca umiditatea relativă să fie menținută în intervalul de 30 până la 70 %, dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

**Substanța chimică testată: concentrația nominală**

23. Când este posibil, se calculează și se consemnează concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală reprezintă masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este utilizată pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

**Substanța chimică testată: concentrația efectivă**

24. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie să fie susținută printr-un studiu preliminar privind caracterizările specifice ale substanței chimice testate. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponent se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în acest caz sunt necesare date analitice care demonstrează caracterul similar al compoziției materialului antrenat de aer și al materialului inițial. În cazul în care aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară reanalizarea la intervale regulate a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa de suspensie în aer). Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă.
25. Se folosește un lot de substanță chimică testată pe întreaga durată a studiului, dacă este posibil, iar proba testată trebuie să fie păstrată în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței chimice testate, care să includă puritatea sa și, dacă este fezabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără să se limiteze la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară determinată prin analize de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei testate nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu culoare, natura fizică etc.).

## ▼ M4

26. Atmosfera de expunere trebuie să se mențină cât mai constantă posibil. Pentru a demonstra stabilitatea condițiilor de expunere se poate utiliza un dispozitiv de monitorizare în timp real, de exemplu un fotometru pentru aerosoli sau un analizor de carbon total pentru vapori. Concentrația efectivă în incintă se măsoară ce puțin de 3 ori în timpul fiecărei zile de expunere, pentru fiecare nivel de expunere. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. În mod ideal, această probă se colectează apoi pe întreaga perioadă de expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu trebuie să se abată de la concentrația medie cu mai mult de  $\pm 10\%$  pentru gaze și vapori sau  $\pm 20\%$  pentru aerosoli cu lichide sau solide. Trebuie să se calculeze și să se înregistreze timpul necesar pentru echilibrarea incintei ( $t_{95}$ ). Durata unei expuneri acoperă timpul în care se generează substanța chimică testată. Aceasta ia în considerare perioadele necesare pentru atingerea echilibrului în incintă ( $t_{95}$ ) și pentru descompunere. Îndrumări pentru estimarea  $t_{95}$  pot fi găsite în Ghidul 39 (2).
27. Pentru amestecuri foarte complexe formate din gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), fiecare fază se poate comporta diferit într-o incintă de inhalare. Prin urmare, se selectează cel puțin o substanță indicatoare (analit), de obicei substanța activă principală din amestec, din fiecare fază (gaz/vapori și aerosol). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, trebuie să se raporteze concentrația analitică pentru amestecul total și nu doar pentru ingredientul activ sau substanța indicatoare (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

**Substanța chimică testată: distribuția granulometrică**

28. Granulometria aerosolilor se face cel puțin o dată pe săptămână pentru fiecare nivel de concentrație, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de granulometrie (APS). În cazul în care se obține o echivalență a rezultatelor obținute cu impactorul în cascadă și cu un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu.
29. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/barbotor de gaze în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometrică trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența tuturor concentrațiilor în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, trebuie să se ia măsuri pentru a minimiza datele neconcludente care pot duce la necesitatea de repetare a unui studiu.
30. Se efectuează granulometria pentru vapori atunci când există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau în cazul în care se detectează particule într-o atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte.

**OBSERVAȚII**

31. Animalele trebuie să fie observate clinic înainte, în timpul și după perioada de expunere. Poate fi indicată observarea mai frecventă, în funcție de răspunsul animalelor în timpul expunerii. În cazul în care observarea animalelor este împiedicată de utilizarea tuburilor de imobilizare, a incintelor slab iluminate pentru expunerea întregului corp sau a atmosferelor opace, animalele se observă cu atenție după expunere. Prin observarea înainte de expunerea din ziua următoare se poate evalua reversibilitatea sau exacerbarea efectelor toxice.

▼ **M4**

32. Toate observațiile trebuie să fie consemnate în evidențele individuale pentru fiecare animal. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.
33. Observarea animalelor în cușcă urmărește modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor; modificarea sistemului respirator și circulator, modificările sistemului nervos și modificări în activitatea somato-motorie și în modelele comportamentale. Se va acorda o atenție specială observării tremorului, convulsiilor, salivării, diareei, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi de bradipnee reflexă sau hipo/hipertermie asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate. În protocolul studiului se pot include evaluări suplimentare, de exemplu cinetica, biomonitorizarea, funcționarea plămânilor, retenția unor materiale puțin solubile care se acumulează în țesutul pulmonar și modificările comportamentale.

**GREUTATEA CORPORALĂ**

34. Greutățile individuale ale animalelor se consemnează cu puțin înaintea primei expuneri (ziua 0), apoi de două ori pe săptămână (de exemplu: vineri și luni, pentru a evidenția recuperarea după un weekend fără expunere sau la un interval de timp pentru a permite evaluarea toxicității sistemice), precum și la momentul morții sau eutanasierii. În cazul în care nu există efecte în primele 2 săptămâni, greutatea corporală se poate măsura săptămânal pe restul duratei studiului. Animalele din grupuri satelit (de reversibilitate) (în cazul în care sunt folosite) se cântăresc în continuare săptămânal pe întreaga perioadă de recuperare. La încheierea studiului, toate animalele sunt cântărite cu puțin înainte de sacrificare, pentru a permite calcularea corectă a rapoartelor între greutatea organelor și cea corporală.

**CONSUMUL DE HRANĂ ȘI APĂ**

35. Consumul de hrană se măsoară săptămânal. Se poate măsura și consumul de apă.

**PATOLOGIA CLINICĂ**

36. Evaluările de patologie clinică se efectuează pentru toate animalele, inclusiv pentru animalele din grupurile martor și satelit (de reversibilitate), atunci când sunt sacrificate. Trebuie să se consemneze intervalul de timp între încetarea expunerii și recoltarea de sânge, în special dacă restabilirea efectului vizat este rapidă. Se recomandă prelevarea după expunere pentru acei parametri cu timp scurt de înjumătățire plasmatică (de exemplu, COHb, CHE și MetHb).
37. Tabelul 1 prezintă parametrii de patologie clinică necesari în general pentru toate studiile toxicologice. Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când se consideră util pe baza toxicității anticipate sau observate. Conducătorul studiului poate opta pentru evaluarea unor parametri suplimentari în vederea unei mai bune caracterizări a toxicității substanței chimice testate (de exemplu, colinesteraza, lipidele, hormonii, echilibrul acido-bazic, methemoglobina sau corpii Heinz, creatin-kinaza, raportul mieloid/eritroid, troponinele, gazele din sângele arterial, dehidrogenaza lactică, sorbitol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza și gama glutamil transpeptidaza).



▼ **M4**

Tabelul 1

**Parametri standard de patologie clinică**

| Examen hematologic                           |  |
|--|--|
| Număr de eritrocite                          | Număr total de leucocite               |
| Hematocrit                                   | Formulă leucocitară                    |
| Concentrația de hemoglobină                  | Număr de plachete                      |
| Hemoglobina corpusculară medie               | Potențial de coagulare (selecțiunile): |
| Volumul corpuscular mediu                    | — timp de protrombină                  |
| Concentrația hemoglobinei corpusculare medii | — timp de coagulare;                   |
| Reticulocite                                 | — timp de tromboplastină parțial       |
| Chimie clinică                               |  |
| Glucoză (*)                                  | Alanin aminotransferază                |
| Colesterol total                             | Aspartat aminotransferază              |
| Trigliceride                                 | Fosfatază alcalină                     |
| Azot ureic sangvin                           | Potasiu                                |
| Bilirubină totală                            | Sodiu                                  |
| Creatinină                                   | Calciu                                 |
| Proteine totale                              | Fosfor                                 |
| Albumină                                     | Clor                                   |
| Globulină                                    |  |
| Analiza urinei (opțional)                    |  |
| Aspect (culoare și turbiditate)              | Proteine totale                        |
| Volum  | Glucoză                                |
| Greutate specifică sau osmolalitate          | Hematurie                              |
| pH   |  |

(\*) Deoarece o perioadă îndelungată de privare de hrană poate introduce dezechilibre în măsurătorile de glucoză la animalele tratate, comparativ cu animalele din grupul martor, conducătorul studiului stabilește dacă este cazul ca animalele să fie private de hrană. În cazul în care se aplică o perioadă de privare de hrană, aceasta va fi corespunzătoare speciei folosite; pentru șobolani, perioada poate fi de 16 ore (privare de hrană pe timpul nopții). Determinarea glucozei à jeun se poate face după privarea de hrană pe timpul nopții în ultima săptămână de expunere sau după privarea de hrană pe timpul nopții înainte de autopsiere (în cazul din urmă, împreună cu toți ceilalți parametri de patologie clinică).

38. În cazul în care există dovezi că principalul loc de depunere și retenție este în căile respiratorii inferioare (adică în alveole), lavajul bronhoalveolar (BAL) poate fi tehnica de elecție pentru analiza cantitativă a parametrilor doză-efect ipotetici, cu accentul pe alveolită, inflamație pulmonară și fosfolipidoză. Aceasta permite studierea adecvată a modificărilor doză-răspuns și a evoluțiilor în timp ale leziunilor alveolare. Lichidul BAL poate fi analizat pentru determinarea numărului total de leucocite și a formulei leucocitare, a proteinelor totale și a lactat dehidrogenazei. Alți parametri care pot fi luați în considerare sunt cei care indică leziuni lizozomale, fosfolipidoză, fibroză și inflamație iritantă sau alergică, putând include determinarea citokinelor/chemokinelor pro-inflamatoare. În general, măsurătorile BAL completează rezultatele examinărilor histopatologice, dar nu le pot înlocui. Îndrumări pentru modul de efectuare a lavajului pulmonar pot fi găsite în Ghidul 39 (2).



▼ **M4****PATOLOGIA MACROSCOPICĂ ȘI GREUTATEA ORGANELOR**

39. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animalelor, sunt supuse unei evacuări complete a sângelui (dacă este posibil) și unei autopsii. Se consemnează timpul între încheierea ultimei expunerii a fiecărui animal și sacrificarea sa. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce s-a descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se efectuează imediat ce este posibil, în mod normal după o zi sau două. Toate modificările patologice majore se consemnează pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.
40. Tabelul 2 prezintă organele și țesuturile care se păstrează într-un mediu corespunzător în timpul autopsiei, în vederea unor examene histopatologice. Conservarea organelor și țesuturilor [din paranteze] și a altor organe și țesuturi rămâne la aprecierea conducătorului studiului. Organele trecute cu caractere **aldine** se curăță și se cântăresc în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Tiroida și epididimul se cântăresc doar dacă este necesar, deoarece artefactele în urma curățării pot împiedica evaluarea histopatologică. Țesuturile și organele se fixează în soluție de formol de 10 % tamponat sau în alt fixator adecvat, imediat după autopsie și la nu mai puțin de 24-48 de ore înainte de curățare, în funcție de fixatorul folosit.

Tabelul 2

**Organe și țesuturi conservate în cursul autopsiei**

|  |   |
|--|---|
| <b>Glande suprarenale</b>  | Vezicule seminale   |
| Măduvă osoasă (și/sau aspirat proaspăt)  | Măduva spinării (cervicală, toracică mediană și lombară)  |
| <b>Creier</b> (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și punte)  | <b>Splină</b>   |
| [Ochi (retină, nerv optic) și pleoape]   | Stomac  |
| <b>Inimă</b>   | <b>Testicule</b>  |
| <b>Rinichi</b>   | <b>Timus</b>  |
| Laringe (3 niveluri, 1 nivel pentru a include baza epiglotei)  | Tiroidă   |
| <b>Ficat</b>   | Trahee (minimum 2 niveluri, inclusiv o secțiune longitudinală prin carină și o secțiune transversală) |
| <b>Plămân</b> (toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale)  | [Vezica urinară]  |
| Noduli limfatici din zona hilusului pulmonar, în special în cazul substanțelor chimice testate cu particule slab solubile. Pentru examinări și studii mai aprofundate de natură imunologică, se pot lua în considerare noduli limfatici suplimentari, de exemplu cei din regiunile mediastinale, cervicale/submandibulare și/sau auriculare. | Uter  |
| Țesuturi nazo-faringiene (minimum 4 niveluri; 1 nivel include ductul nazo-faringian și țesutul limfoid asociat mucoasei nazale (NALT))   | Toate leziunile macroscopice  |
| Esofag   |   |
| [Bulb olfactiv]  |   |
| Ovare  |   |

▼ **M4**

41. Plămânii se prelevează în stare intactă, se cântăresc și se tratează cu un fixator adecvat la o presiune de 20-30 cm coloană de apă, pentru a asigura conservarea structurii pulmonare (5). Secțiunile se colectează pentru toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale, dar în cazul în care se efectuează lavajul pulmonar, lobul nelavat se secționează pe trei niveluri (fără secțiuni seriale).
42. Se examinează cel puțin 4 niveluri de țesuturi nazo-faringiene, dintre care unul include ductul nazo-faringian, (5, 6, 7, 8, 9), pentru a permite examinarea adecvată a epiteliului scuamos, tranzițional (respirator neciliat), respirator (respirator ciliat) și olfactiv, precum și a țesutului limfatic de drenare (NALT; 10, 11). Se examinează trei niveluri ale laringelui, iar unul dintre aceste niveluri trebuie să includă baza epiglotei (12). Se examinează cel puțin trei niveluri ale traheei, inclusiv o secțiune longitudinală prin carina de la bifurcarea bronhiilor extrapulmonare și o secțiune transversală.

**EXAMENUL HISTOPATOLOGIC**

43. Se efectuează o evaluare histopatologică a tuturor organelor și țesuturilor enumerate în tabelul 2 pentru grupurile martor și grupurile de concentrație ridicată și pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificate în cursul studiului. Se acordă o atenție specială căilor respiratorii, organelor-țintă și leziunilor macroscopice. Organele și țesuturile care prezintă leziuni în grupul de concentrație ridicată se examinează la toate grupurile. Conducătorul studiului poate alege să efectueze examenele histopatologice pentru grupuri suplimentare, pentru a demonstra o relație clară între concentrație și răspuns. Atunci când se folosește un grup satelit (de reversibilitate), trebuie să se efectueze un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la s-au identificat efecte în grupurile tratate. În cazul în care intervin excesiv de multe decese premature sau alte probleme în grupul cu expunere ridicată, care compromit semnificația datelor, se examinează histopatologic următorul nivel de concentrație inferioară. Se încearcă o corelare a observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

**DATE ȘI RAPORT****Date**

44. Trebuie să se furnizeze date individuale despre animale referitoare la greutatea corporală, consumul de hrană, patologia clinică, patologia macroscopică, greutatea organelor și examenul histopatologic. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup testat prezentându-se numărul de animale utilizate, numărul de animale care au manifestat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate din rațiuni umane, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei. Toate rezultatele cantitative și incidentale se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Se poate folosi orice metodă statistică acceptată, iar metodele statistice și datele care urmează să fie analizate se aleg în etapa de concepție a studiului.

**Raportul de testare**

45. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații, după caz:

*Animalele testate și îngrijirea lor*

- descrierea condițiilor de ținere în cuști, printre care: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de iluminat și identificarea regimului alimentar;

**▼ M4**

- specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea altor animale decât șobolanul. Se prezintă sursa și datele anterioare în cazul în care provin de la animale expuse la condiții similare de expunere, adăpost și privare de hrană;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- metoda de randomizare;
- descrierea tuturor condițiilor dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli.

*Substanța chimică testată*

- natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);
- date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut.

*Vehiculul*

- justificarea utilizării și alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);
- date istorice sau concomitente care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului.

*Incinta de inhalare*

- descrierea incintei de inhalare, inclusiv volumul și o diagramă;
- sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și generarea atmosferei;
- echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, granulometriei și concentrației efective;
- sursa de aer și sistemul folosit pentru condiționare;
- metodele folosite pentru calibrarea echipamentului, pentru a asigura o atmosferă de testare omogenă;
- diferența de presiune (pozitivă și negativă);
- orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);
- stabilitatea atmosferei de testare;
- amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;
- tratarea aerului introdus/extras.
- debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (pentru expunerea întregului corp);
- timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare ( $t_{95}$ );
- numărul modificărilor volumetrice pe oră;
- dispozitive de măsurare (după caz).

*Datele privind expunerea*

- justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;

**▼ M4**

- concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);
- concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), fiecare poate fi analizată separat;
- toate concentrațiile în aer trebuie să fie consemnate în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m<sup>3</sup> etc.), mai degrabă decât în unități de volum (de exemplu, ppm, ppb etc.);
- distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică ( $\sigma_g$ ), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Trebuie să se consemneze analizele granulometrice individuale.

*Condițiile de testare*

- detaliile preparării substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor de materiale solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate;
- descrierea (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;
- detalii privind echipamentul utilizat pentru monitorizarea temperaturii incintei, umidității și debitului de aer prin incintă (adică realizarea unei curbe de calibrare);
- detalii privind echipamentul utilizat pentru prelevarea probelor pentru determinarea concentrației în incintă și a distribuției granulometrice;
- detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);
- metoda de randomizare în evaluarea animalelor din grupurile de testare și martor;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);
- justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare.

*Rezultate*

- prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;
- prezentarea tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;
- prezentarea tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și  $\sigma_g$ ;
- prezentarea tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

**▼ M4**

- prezentarea tabelară a greutateii animalelor individuale;
- prezentarea tabelară a consumului de hrană;
- prezentarea tabelară a datelor de patologie clinică;
- concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;
- prezentarea tabelară a celorlalți parametri măsurați.

*Discutarea și interpretarea rezultatelor*

- trebuie acordată o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;
- inhalabilitatea particulelor trebuie să fie abordată în perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot îndeplini criteriile privind granulometria;
- în evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să se includă coerența metodelor folosite pentru a determina concentrațiile nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;
- trebuie să se studieze cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);
- trebuie să se prezintă o explicație în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezentau semne de suferință gravă și prelungită, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3).
- trebuie să se identifice organul sau organele-țintă;
- trebuie să se determine NOAEL și LOAEL.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) OECD (1981), Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan J.E. și Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

**▼M4**

- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. În: Waalkes M.P. și Ward J.M. (eds.), *Carcinogenesis, Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hamelers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

**▼ M4***Apendicele 1*

## DEFINIȚIE

**Substanță chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

**▼B****B.9. TOXICITATE LA DOZĂ REPETATĂ (28 DE ZILE)  
(ADMINISTRARE CUTANATĂ)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera A).

**1.2. DEFINIȚII**

A se vedea introducerea generală partea B (litera B).

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Se aplică zilnic substanța de testat pe cale cutanată, în doze crescătoare, mai multor loturi de testare, fiind administrată o doză pe lot timp de 28 de zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, se observă zilnic animalele pentru a pune în evidență simptomele de toxicitate. Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului, sunt supuse autopsiei.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează la întâmplare în loturi tratate și loturi martor. Cu puțin timp înainte de testare, se tunde blana din regiunea dorsală a animalelor. Se poate recurge la radere, dar în acest caz operația se efectuează cu cca. 24 de ore înainte de test. Repetarea este, de obicei, necesară la intervale aproximativ săptămânale. În timpul tunderii sau al raderii, trebuie evitată orice lezare a pielii. Suprafața care se degajează în vederea aplicării substanței de testat nu trebuie să fie mai mică de 10 % din suprafața corporală. Pentru a decide zona care trebuie degajată și dimensiunile suprafeței care trebuie tratată, se ia în calcul greutatea animalului. Dacă testul vizează substanțele solide care, dacă este cazul, se pot pulveriza, substanța de testat trebuie umezită cu ajutorul apei sau, la nevoie, al unui vehicul adecvat, astfel încât să se poată obține un bun contact cu pielea. Substanțele lichide se folosesc, în general, în stare nediluată. Se efectuează o aplicare zilnică timp de 5 până la 7 zile pe săptămână.

**1.6.2. Condiții de testare****1.6.2.1. Animale de experiență**

Animalele de laborator utilizate sunt șobolanul, iepurele sau cobaiul adult. Pot fi folosite și alte specii, dar folosirea lor trebuie justificată.



**▼B**

La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de  $\pm 20\%$  valoarea medie.

#### 1.6.2.2. *Număr și sex*

Se folosesc, pentru fiecare doză, cel puțin 10 animale (5 femele și 5 masculi) a căror piele este sănătoasă. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 10 de animale (5 din fiecare sex) la doza maximă timp de 28 de zile, care poate fi supus observației vizând reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 14 zile care urmează tratamentului. Se folosește, de asemenea, un lot satelit cu 10 animale martor (5 de fiecare sex).

#### 1.6.2.3. *Doze*

Se folosesc cel puțin trei doze, precum și un lot martor sau, dacă este cazul, un lot martor pentru vehicul. Perioada de expunere este de cel puțin șase ore pe zi. Se aplică substanța de testat în fiecare zi în același moment, iar dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a se menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Cu excepția substanței de testat, se tratează animalele din lotul martor la fel cu cele din grupul de experiment. În cazul în care se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea dozei, acesta este administrat lotului martor în aceleași condiții ca și pentru loturile tratate, iar doza administrată corespunde cu cea primită de grupul tratat cu doza maximă. Doza maximă produce efecte toxice, dar nu provoacă sau provoacă rar moartea. Doza minimă nu provoacă niciun efect toxic. Atunci când există informații privind expunerea umană, doza cea mai mică trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă minime efecte toxice observabile. În cazul în care se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund dozelor slabe și intermediare, precum și în loturile martor incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

În cazul în care aplicarea substanței de testat provoacă o iritație cutanată gravă, se reduc concentrațiile; aceasta poate avea ca efect diminuarea, chiar dispariția, celorlalte efecte toxice la doza maximă. De asemenea, dacă leziunile cutanate sunt foarte grave, poate fi necesară oprirea experimentului și inițierea unui studiu nou, la concentrații mai scăzute.

#### 1.6.2.4. *Testul-limită*

În cazul în care în urma unei experiențe preliminare realizate cu o doză de 1 000 mg/kg sau o doză mai ridicată în funcție de expunerea umană posibilă, când se cunoaște această valoare, nu apare niciun efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă.

#### 1.6.2.5. *Perioada de observație*

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

**▼B****1.6.3. Mod de operare**

Se pun animalele în cuști individuale. În condiții ideale, substanța de testat se administrează animalelor 7 zile pe săptămână timp de 28 de zile. Animalele din orice grup satelit destinate observației ulterioare sunt menținute în viață timp de încă 14 zile, fără tratament, în vederea constatării vindecării sau a persistenței efectelor toxice. Durata de expunere este de minimum șase ore pe zi.

Substanța de testat se aplică pe o suprafață aproximativ egală cu 10 % din suprafața totală a corpului. În cazul substanțelor puternic toxice, suprafața tratată poate fi mai mică, dar stratul trebuie să fie cât mai subțire și mai uniform posibil.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament de tifon și al unui plasture neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină pansamentul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acesteia de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă. Ca alternativă poate fi folosit un „dispozitiv de protecție cu guler înalt”.

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observațiile includ, între altele, modificări ale părului și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale sistemului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și ale sistemului nervos central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal greutatea animalelor. Se recomandă, de asemenea, determinarea săptămânală a consumului alimentar. Animalele sunt observate cu regularitate pentru a evita pe cât posibil pierderea lor din motive exterioare experimentului, precum: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul experimentului, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor tratate nesatelite. Animalele muribunde și animalele cu suferințe sau dureri grave se scot, se eutanasiază și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează la sfârșitul perioadei de testare asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

1. examen hematologic, inclusiv: hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de eritrocite, formula leucocitară și măsurători ale potențialului de coagulare;
2. determinările biochimice clinice ale sângelui cuprinzând cel puțin un parametru al funcției hepatice și unul al celei renale: alanin aminotransferaza (cunoscută anterior ca transaminaza serică glutamo-piruvică), aspartat aminotransferaza (cunoscută anterior ca transaminaza serică glutamo-oxaloacetică), azotul ureic, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale.

Alte determinări care se pot dovedi necesare pentru o evaluare toxicologică adecvată cuprind: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun, analiza lipidelor și a hormonilor, echilibrul acido-bazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică.

**▼B**

Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate.

#### 1.6.4. **Autopsie**

Toate animalele supuse testului fac obiectul unei autopsii generale. Se cântăresc în stare umedă ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele cât mai rapid posibil după disecție pentru a evita deshidratarea. Se conservă într-un mediu adecvat ficatul, rinichii, splina, testiculele, glandele suprarenale și inima, precum și orice organ care prezintă leziuni macroscopice sau modificări volumetrice în vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare.

#### 1.6.5. **Examen histopatologic**

Pentru lotul expus la doza maximă și pentru lotul martor se întreprinde un examen histopatologic al organelor și al țesuturilor conservate. Organele și țesuturile care prezintă leziuni induse pe suprafața de testare la nivelul dozei maxime se examinează în toate loturile care au fost expuse unor doze mai mici. Animalele din lotul satelit fac obiectul unui examen histopatologic axat în special pe organele și țesuturile pentru care s-au constatat leziuni în celelalte loturi tratate.

### 2. **DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune.

Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

### 3. **RAPORT**

#### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- date privind animalele (specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.);
- condițiile de testare (inclusiv tipul de pansament: ocluziv sau neocluziv);
- dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;
- dacă este posibil, nivelul care nu are niciun efect;
- răspunsul toxic pe sexe și doză;
- momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;
- efectele toxice sau de altă natură;
- momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;
- cantitățile de hrană și greutatea corporală;
- examenele hematologice întreprinse și rezultatele;

**▼B**

- testele biochimice clinice practicate și rezultatele;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
- tratarea statistică a rezultatelor, când este cazul;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera D).

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera E).

**▼B****B.10. MUTAGENITATEA –TESTUL *IN VITRO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE CELULE DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 473 a OCDE, Testul *in vitro* de aberație cromozomială pe celule de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Scopul testului *in vitro* de aberație cromozomială este destinat depistării agenților care provoacă aberații cromozomiale ale structurii în celulele de mamifere, în cultură (1) (2) (3). Aberațiile structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. O poliploidie crescută poate să indice că un produs chimic are capacitatea de a provoca aberații ale numărului de cromozomi. Cu toate acestea, prezenta metodă nu este destinată determinării aberațiilor numerice și, în general, nu se utilizează în acest scop. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi suficiente ale implicării mutațiilor cromozomiale și a fenomenelor conexe, care provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori din celulele somatice, în inducerea cancerului la oameni și la animalele de laborator.

Testul *in vitro* de aberație cromozomială poate să utilizeze culturi de linii celulare stabilite, sușe celulare sau culturi celulare primare. Celulele utilizate se selectează în funcție de potențialul de dezvoltare în cultură, stabilitatea cariotipului, numărul de cromozomi, diversitatea cromozomilor și frecvența aberațiilor cromozomiale spontane.

Pentru realizarea *in vitro* a testului este necesar să se utilizeze o sursă exogenă pentru activarea metabolică. Sistemul de activare metabolică de acest tip nu poate să reproducă integral condițiile celulelor de mamifere *in vivo*. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea să conducă la obținerea unor rezultate pozitive care nu reflectă o mutagenitate intrinsecă, condiții care s-ar putea datora modificărilor de pH, de osmolalitate sau unor valori mari ale citotoxicității (4) (5).

Prezentul test se utilizează pentru depistarea substanțelor cu posibile efecte mutagene și cancerigene pentru mamifere. Mulți compuși care dau rezultate pozitive la acest test sunt cancerigeni pentru mamifere; cu toate acestea, nu există o corelație perfectă între prezentul test și cancerigenitate. Corelația depinde de clasa de produse chimice și sunt tot mai multe dovezi că există agenți cancerigeni care nu se depistează prin prezentul test deoarece este posibil ca aceștia să acționeze printr-un alt mecanism decât cel care provoacă leziuni directe ale ADN.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Aberație de tip cromatidic:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea cromatidelor singure sau prin divizarea și reuniunea între cromatide.

**Aberație de tip cromozomial:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea sau divizarea și reuniunea ambelor cromatide în același situs.

▼ **B**

**Endoreduplicare:** proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă fază S. Rezultă cromozomi cu 4, 8, 16, ... cromatide.

**Lacună:** leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

**Index mitotic:** numărul celulelor în metafază împărțit la numărul total de celule observate într-o populație de celule; indică gradul de proliferare a populației respective.

**Aberație numerică:** modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru celulele utilizate.

**Poliploidie:** multiplicare a numărului ( $n$ ) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (și anume  $3n$ ,  $4n$  etc.).

**Aberație structurală:** modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Culturile de celule sunt expuse la substanța de testat, atât cu, cât și fără activare metabolică. După expunerea celulelor la substanța de testat, acestea se tratează la intervale de timp prestabilite cu o substanță de inhibare a metafazei (de exemplu Colcemid® sau colchicină), se recoltează, se colorează și celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

### 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

#### 1.4.1. **Preparatele**

##### 1.4.1.1. *Celulele*

Se pot utiliza diferite linii celulare, sușe de celule sau culturi de celule primare, inclusiv celule umane (de exemplu celule de hamster chinezesc, limfocite din sângele periferic uman sau al altor mamifere).

##### 1.4.1.2. *Mediile și condițiile de cultură*

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare (vasele de cultură, concentrația  $\text{CO}_2$ , temperatura și umiditatea) corespunzătoare pentru dezvoltarea culturilor. Se impune controlul regulat al liniilor și sușelor celulare, pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu micoplasmă și, dacă se constată contaminarea, celulele nu se mai folosesc. Ar trebui să se cunoască perioada ciclului celular normal pentru celulele și condițiile de cultură utilizate.

##### 1.4.1.3. *Prepararea culturilor*

Liniile și sușele celulare stabilite: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se înșămânțează în mediul de cultură într-o anumită densitate, astfel încât culturile să nu ajungă la confluență înainte de momentul recoltării, apoi se incubează la  $37^\circ\text{C}$ .

**▼B**

Limfocitele: sângele complet, tratat cu un anticoagulant (de exemplu heparina) sau limfocitele separate obținute de la subiecți sănătoși se adaugă la mediul de cultură ce conține un mitogen (de exemplu fitohemaglutinină) și se incubează la 37 °C.

#### 1.4.1.4. *Activarea metabolică*

Se recomandă ca expunerea celulelor la substanța de testat să se realizeze atât în prezența, cât și în absența sistemului de activare metabolică corespunzător. Sistemul cel mai frecvent utilizat este o fracție postmitocondrială la care s-au adăugat cofactori (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (10) (11) (12).

Fracția postmitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între limitele 1-10 % v/v în mediul experimental final. Compoziția unui sistem de activare metabolică poate să depindă de clasa din care face parte substanța chimică de testat. În unele cazuri, s-ar putea să fie convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale.

O serie de realizări, inclusiv crearea prin inginerie genetică a unor linii celulare care exprimă enzime activatoare specifice, poate furniza potențialul pentru o activare endogenă. Alegerea liniilor celulare ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific (de exemplu prin importanța izoenzimei citocromului P450 pentru metabolismul substanței de testat).

#### 1.4.1.5. *Substanța de testat/prepararea*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului celulelor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele experimentale și se diluează înainte de utilizare în tratamentul celulelor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

### 1.4.2. **Condițiile de testare**

#### 1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul ar trebui să fie ales, astfel încât să nu existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat și să nu afecteze negativ supraviețuirea celulelor și activitatea S9. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere un solvent/vehicul în soluție/dispersie apoasă. La testarea substanțelor instabile în apă, solventul organic utilizat nu ar trebui să conțină apă. Apa se poate elimina prin adăugarea unei site moleculare.

#### 1.4.2.2. *Concentrațiile de expunere*

Printre criteriile ce trebuie să fie avute în vedere la determinarea dozei maxime sunt citotoxicitatea, solubilitatea în sistemul experimental și modificările de pH sau osmolalitate.

Citotoxicitatea ar trebui să se determine cu și fără activare metabolică în experimentarea principală, utilizând un indicator corespunzător al integrității și dezvoltării celulare, ca gradul de confluență, numărul de celule viabile sau indexul mitotic. Ar putea fi utilă determinarea citotoxicității și solubilității într-un test preliminar.

## ▼B

Ar trebui să se utilizeze cel puțin trei concentrații analizabile. Dacă o substanță este citototoxică, concentrațiile respective ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la maximă la mică sau lipsa toxicității; aceasta semnifică, de obicei, concentrații care ar trebui să fie separate printr-un factor cuprins între 2 și  $\sqrt{10}$  maximum. În momentul recoltării, concentrația maximă ar trebui să determine o reducere importantă a gradului de confluență, a numărului de celule sau a indexului mitotic (pentru toate mai mare de 50 %). Indexul mitotic variază în timp după tratament și reprezintă doar o măsură indirectă a efectelor citotoxice/citostatice. Cu toate acestea, indexul mitotic este acceptabil pentru culturile în suspensie în care alte determinări de toxicitate pot să fie dificile și nepractice. Datele de cinetică a ciclului celular, cum ar fi timpul de generare medie (TGM), ar putea să reprezinte informații suplimentare. TGM este totuși o medie generală, care nu demonstrează întotdeauna existența unei subpopulații întârziate; chiar și creșterile ușoare ale timpului de generare medie pot să genereze o întârziere foarte substanțială a momentului în care numărul de aberații este optim.

Pentru substanțele relativ necitotoxice, concentrația experimentală maximă trebuie să fie cea mai mică dintre următoarele: 5  $\mu\text{l/ml}$ , 5 mg/ml sau 0,01 M.

Pentru substanțele relativ insolubile care nu sunt toxice la concentrații mai mici decât concentrația la care sunt insolubile, doza maximă utilizată ar trebui să fie o concentrație superioară limitei de solubilitate în mediul final de cultură la terminarea perioadei de tratament. În unele cazuri (de exemplu atunci când toxicitatea se manifestă doar la o concentrație mai mare decât concentrația minimă de insolubilitate), se recomandă să se încerce mai multe concentrații până la apariția precipitării. Ar putea fi utilă evaluarea solubilității la începutul și la sfârșitul tratamentului, deoarece solubilitatea poate să varieze în timpul expunerii în sistemul experimental datorită prezenței celulelor, S9, serului etc. Insolubilitatea se poate constata cu ochiul liber. Ar trebui ca precipitarea să nu interfereze cu determinarea rezultatelor.

#### 1.4.2.3. Martorii negativi și pozitivi

La fiecare experiment, ar trebui să se includă simultan martorii pozitivi și negativi (solvent și vehicul), atât cu, cât și fără activare metabolică. În prezența unui sistem de activare metabolică, substanța utilizată ca martor pozitiv ar trebui să fie aceea care necesită activare pentru a da un răspuns mutagen.

Ca martori pozitivi ar trebui să se utilizeze un elastogen cunoscut, la niveluri de expunere care se estimează că determină o creștere reproductibilă și detectabilă în raport cu zgomotul de fond, ceea ce demonstrează sensibilitatea sistemului de testare.

Concentrațiile martorilor pozitivi ar trebui să fie selectate astfel încât să se obțină efecte clare, dar care să nu permită identificare imediată a lamelelor codificate. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

| Starea activării metabolice          | Substanța              | Nr. CAS | Nr. EINECS |
|--------------------------------------|------------------------|---------|------------|
| Absența activării metabolice exogene | metansulfonat de metil | 66-27-3 | 200-625-0  |
|                                      | metansulfonat de etil  | 62-50-0 | 200-536-7  |



**▼B**

| Starea activării metabolice           | Substanța                                    | Nr. CAS              | Nr. EINECS |
|---------------------------------------|--|----------------------|------------|
|                                       | etil nitrozouree                             | 759-73-9             | 212-072-2  |
|                                       | mitomicină C                                 | 50-07-7              | 200-008-6  |
|                                       | 4-nitrochinolină-N-oxid                      | 56-57-5              | 200-281-1  |
| Prezența activării metabolice exogene | benzo[a] piren                               | 50-32-8              | 200-028-5  |
|                                       | ciclofosfamidă<br>ciclofosfamidă mono-hidrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4  |

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea ca martori pozitivi a unor substanțe din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibile.

Pentru fiecare moment de recoltare, ar trebui să se utilizeze ca martori negativi solvenți sau vehicule singure în mediul de tratare, care se tratează în același condiții ca și culturile tratate. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

#### 1.4.3. Modul de lucru

##### 1.4.3.1. *Tratamentul cu substanța de testat*

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat în prezența sau absența unui sistem de activare metabolică. Tratamentul limfocitelor ar trebui să înceapă la aproximativ 48 de ore de la stimularea mitogenică.

1.4.3.2. Pentru fiecare concentrație ar trebui să se realizeze în mod normal teste pe culturi de celule în dublu exemplar, procedură recomandată cu fermitate pentru culturile cu martor negativ/solvent. Dacă datele testelor anterioare pot să dovedească existența unor diferențe minime între culturile duble (13) (14), se poate preconiza utilizarea unor culturi unice pentru fiecare concentrație testată.

Substanțele în stare gazoasă sau cele volatile ar trebui să fie testate prin metode corespunzătoare, de exemplu în vase de cultură închise ermetic (15) (16).

##### 1.4.3.3. *Momentul recoltării culturilor*

În primul experiment, expunerea celulelor la substanța de încercat ar trebui să se realizeze atât în prezența, cât și în absența activării metabolice, timp de 3-6 ore, și să se procedeze la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (12). Dacă rezultatele testului sunt negative, atât în prezența, cât și în absența activării, ar trebui să se repete testul fără activare, cu tratament continuu până în momentul prelevării probelor care să fie egal cu aproximativ de 1,5 ori durata ciclului celular normal. S-ar putea ca unele produse chimice să fie detectate mai ușor, prin prelungirea timpului de tratament/prelevare a probelor la mai mult de 1,5 ori durata ciclului celular. Rezultatele negative obținute în prezența activării metabolice necesită o confirmare pentru fiecare caz. Pentru cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, trebuie să se prezinte o justificare.

**▼B****1.4.3.4. Prepararea cromozomilor**

Culturile celulare se tratează cu Colcemid® sau colchicină, de obicei timp de 1-3 ore înainte de recoltare. Fiecare cultură celulară se recoltează și se prelucrează separat pentru prepararea cromozomilor. Prepararea cromozomilor include tratamentul hipotonic al celulelor, precum și fixarea și colorarea acestora.

**1.4.3.5. Analiza**

Toate lamelele, inclusiv cele cu martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent înaintea analizei microscopice. Deoarece procedurile de fixare generează adesea scindarea unei proporții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele înregistrate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu numărul modal  $\pm 2$  pentru toate tipurile de celule. Pentru fiecare concentrație și fiecare martor ar trebui să se înregistreze cel puțin 200 de celule în metafază bine etalate, repartizate în mod egal între culturile în dublu exemplar, dacă este cazul. Atunci când se constată un număr mare de aberații, numărul menționat se poate reduce.

Deși scopul testului este detectarea aberațiilor cromozomial-structurale ale cromozomilor, este important să se semnaleze cazurile de poliploidie și endoreduplicare, dacă se constată apariția acestora.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Unitatea experimentală este celula și, prin urmare, ar trebui să se evalueze procentul de celule care prezintă o aberație cromozomială sau mai multe aberații cromozomiale. Se întocmește o listă cu diferitele tipuri de aberații cromozomiale și se specifică numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele se înregistrează și se prezintă separat, dar în general nu se includ în frecvența totală a aberațiilor.

De asemenea, se înregistrează rezultatele determinărilor concomitente de citotoxicitate realizate pentru toate culturile tratate și pentru cele martor negativ în principalele teste de aberații.

Ar trebui să se prezintă date pentru fiecare cultură. În plus, toate datele ar trebui să fie prezentate centralizat sub formă de tabel.

Nu este necesară verificarea unui răspuns pozitiv net. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin realizarea de teste suplimentare în care este preferabil să se modifice condițiile de testare. Necesitatea confirmării rezultatelor negative s-a discutat la punctul 1.4.3.3. În cazul experimentelor suplimentare, ar trebui să se aibă în vedere modificările parametrilor cercetați pentru a extinde gama condițiilor evaluate. Parametrii studiați, susceptibili de modificare, includ intervalele dintre concentrații și condițiile de activare metabolică.

**2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de concentrație sau o creștere reproductibilă a numărului de celule cu aberații cromozomiale. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se pot utiliza metode statistice (3) (13). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

**▼B**

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța de testat este capabilă să inhibe procesele mitotice și să producă aberații ale numărului de cromozomi. O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța de testat poate inhiba avansarea ciclului celular (17) (18).

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în sistemul respectiv.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în rare cazuri datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale testului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vitro* de aberație cromozomială indică faptul că substanța de testat provoacă aberații cromozomiale ale structurii în celulele somatice de mamifere, în cultură. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu provoacă aberații cromozomiale în celulele somatice de mamifere, în cultură.

### 3. **RAPORT**

#### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/Vehiculul:

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Celulele:

- tipul și sursa celulelor;
- caracteristicile cariotipului și motivul alegerii celulelor utilizate;
- absența micoplasmei, dacă este cazul;
- date privind durata ciclului celular;
- sexul donatorilor de sânge, sângele complet sau limfocite izolate, mitogenul utilizat;
- numărul de reînsămânțări, dacă este cazul;
- metodele de întreținere a culturilor celulare, dacă este cazul;
- numărul modal de cromozomi.

Condițiile de testare:

- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrațiile acestora și timpul de expunere a celulelor;
- justificarea alegerii concentrațiilor și numărului de culturi, inclusiv datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate, dacă sunt disponibile;
- compoziția mediului, concentrația de CO<sub>2</sub>, dacă este cazul;

**▼B**

- concentrația substanței de testat;
- volumul vehiculului și al substanței de testat adăugate;
- temperatura de incubare;
- timpul de incubare;
- durata tratamentului;
- densitatea celulară la însămânțare, dacă este cazul;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- martorii pozitivi și negativi;
- metodele de preparare a lamelelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;
- numărul de metafaze analizate;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

## Rezultatele:

- semnele de toxicitate, de exemplu gradul de confluență, datele privind ciclul celular, numărătoarea celulelor, indexul mitotic;
- semnele de precipitare;
- datele privind valoarea pH-ului și osmolalitatea mediului de tratare, dacă s-au determinat;
- definirea aberațiilor, inclusiv a lacunelor;
- numărul de celule cu aberații cromozomiale și tipul aberațiilor cromozomiale, prezentate separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor;
- variațiile ploidiei, dacă există;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Evans, H. J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985). The in Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. *et al.*, (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.

## ▼B

3. Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpio, J., Margolin, G.H., Resnick, M.A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res*, 257, pp. 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
6. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
7. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
8. Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
9. Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
10. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds) *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
12. Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
13. Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
14. Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
15. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.

**▼B**

16. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
18. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.

**▼B****B.11. MUTAGENITATEA – TESTUL IN VIVO DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE MĂDUVĂ OSOASĂ DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 475 a OCDE, Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduvă osoasă de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduva osoasă de mamifere se utilizează la detectarea aberațiilor cromozomiale provocate de substanța de testat în structura celulelor din măduva osoasă a mamiferelor, de obicei, rozătoare (1) (2) (3) (4). Aberațiile structurale pot să fie de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. O poliploidie crescută poate să indice că un produs chimic poate să provoace aberații ale numărului de cromozomi. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi suficiente ale implicării mutațiilor cromozomiale și a fenomenelor conexe, care provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori din celulele somatice, în inducerea cancerului la oameni și în sistemele experimentale.

În prezentul test se utilizează, de obicei, rozătoare. Țesutul-țintă în prezentul test este măduva osoasă, deoarece este un țesut puternic vascularizat și conține o populație de celule cu ciclu rapid care se pot izola și prelucra ușor. Alte specii și țesuturi-țintă nu fac obiectul prezentei metode.

Prezentul test de aberație cromozomială este relevant în special la evaluarea riscului mutagen, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de reparare a ADN-ului, deși aceștia pot să varieze între specii și între țesuturi. Un test *in vivo* este, de asemenea, util pentru studierea suplimentară a unui efect mutagen detectat printr-un test *in vitro*.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu ating țesutul-țintă, utilizarea prezentului test nu potrivită.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Aberație de tip cromatidic:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea cromatidelor singure sau prin divizarea și reuniunea între cromatide.

**Aberație de tip cromozomial:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea sau divizarea și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

**Endoreduplicare:** proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă perioadă S. Rezultă cromozomi cu 4, 8, 16, ... cromatide.

**Lacună:** leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidei(lor).

**Aberație numerică:** modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru celulele utilizate.

## ▼B

**Poliploidie:** multiplicare a numărului ( $n$ ) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (și anume  $3n$ ,  $4n$  etc.).

**Aberație structurală:** modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele se expun la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și se sacrifică în momente corespunzătoare după tratament. Înainte de sacrificare, animalele se supun tratamentului cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu colchicină sau Colcemid®). Apoi, din celulele de măduvă osoasă se realizează preparate cromozomiale care se colorează și celulele în metafază se examinează pentru a se pune în evidență aberațiile cromozomiale.

### 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

#### 1.4.1. **Preparatele**

##### 1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Se utilizează, de obicei, șobolani, șoareci și hamsteri chinezești, deși se poate utiliza orice specie de mamifere potrivită. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase din sușe folosite în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte variații minime, care să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex.

##### 1.4.1.2. *Condițiile de adăpostire și de hrănire*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

##### 1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile.

##### 1.4.1.4. *Prepararea dozelor*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

#### 1.4.2. **Condiții de testare**

##### 1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.



**▼B****1.4.2.2. Martorii**

Pentru fiecare sex și pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvenți/vehicule), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă aberații cromozomiale de structură *in vivo* la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a revela imediat examinatorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul substanței de testat și doar o singură prelevare a probelor. Se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

| Substanța                                   | Nr. CAS              | Nr. EINECS |
|---|----------------------|------------|
| metansulfonat de etil                       | 62-50-0              | 200-536-7  |
| etil nitrozouree                            | 759-73-9             | 212-072-2  |
| mitomicină C                                | 50-07-7              | 200-008-6  |
| ciclofosfamidă<br>ciclofosfamidă monohidrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4  |
| trietilenmelamină                           | 51-18-3              | 200-083-5  |

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicule și manipulați în același fel ca și grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea inter-animale și frecvențele celulelor cu aberații cromozomiale, provenite de la martori anteriori. Dacă, pentru martorii negativi, se face o singură prelevare de probe, momentul cel mai potrivit pentru prelevarea probelor este momentul primei prelevări. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau date publicate, care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

**1.5. MOD DE LUCRU****1.5.1. Numărul și sexul animalelor**

Fiecare grup tratat și grup martor include minimum cinci animale analizabile din fiecare sex. Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceleași specii, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sexul corespunzător.

**1.5.2. Modalitatea de tratare**

Substanțele de testat se administrează de preferință o singură dată. Substanțele de testat se mai pot administra în doze fracționate, și anume două tratamente în aceeași zi la distanță de doar câteva ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare de material. Alte modalități de tratare ar trebui să fie justificate în mod științific.

## ▼B

Prelevarea probelor după tratament ar trebui să se realizeze în două momente diferite din aceeași zi. Pentru rozătoare, primul interval de timp este egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal (acesta din urmă fiind în mod normal de 12-18 ore) după tratament. Deoarece timpul necesar pentru absorbția și metabolismul substanței de testat, precum și acțiunea acesteia asupra cineticii ciclului celular pot să aibă efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se recomandă să se procedeze la o altă prelevare de probe la 24 de ore după prima prelevare. Dacă administrarea dozelor durează mai mult de o zi, ar trebui să se procedeze la o prelevare de probe la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal după tratamentul final.

Înainte de sacrificare, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de agent de inhibare a metafazei (de exemplu Colcemid® sau colchicină). Probele de la animale se prelevează apoi la un interval corespunzător. Pentru șoareci intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore; pentru hamsterii chinezești intervalul este de 4-5 ore. Celule se recoltează din măduva osoasă și se examinează pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

1.5.3. **Doze**

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex, iar regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal (5). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități, de la toxicitatea maximă până la toxicitatea minimă sau lipsă. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (cum ar fi hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în măduva osoasă (de exemplu o reducere cu mai mult de 50 % a indexului mitotic).

1.5.4. **Test-limită**

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corporală, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. Pentru studiile pe termen lung, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi pentru un tratament de până la 14 zile și de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi pentru un tratament mai lung de 14 zile. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul-limită.

1.5.5. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului administrat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

**▼B****1.5.6. Prepararea cromozomilor**

Măduva osoasă se extrage imediat după sacrificare, se expune la o soluție hipotonică și se fixează. Apoi, celulele se întind pe lamele și se colorează.

**1.5.7. Analiza**

Se procedează la determinarea indexului mitotic, care este o măsură a citotoxicității, pe cel puțin 1 000 de celule pentru fiecare animal tratat (inclusiv martorii pozitivi) și pentru fiecare animal martor negativ netratat.

Pentru fiecare animal se analizează minimum 100 de celule. Dacă se observă un număr mai mare de aberații, numărul specificat se poate reduce. Toate lamelele, inclusiv cele cu celule de la martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent, înainte de examinarea la microscop. Deoarece metodele de preparare a lamelelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu  $2n \pm 2$ .

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de aberații per celulă și procentul de celule cu aberație sau aberații cromozomiale de structură. Diferitele tipuri de aberații cromozomiale de structură ar trebui să fie consemnate împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupele tratate și cele martor. Lacunele se consemnează și se raportează separat, dar în general acestea nu se includ în frecvența totală a aberațiilor. Dacă nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele de la ambele sexe se pot combina pentru analiza statistică.

**2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de doză a numărului relativ de celule cu aberații cromozomiale sau o creștere clară a numărului de celule cu aberații dintr-o grupă cu o doză unică la un singur moment de prelevare. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (6). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor de testare.

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța de testat poate produce aberații ale numărului de cromozomi. O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța de testat poate să inhibe avansarea ciclului celular (7) (8).

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

**▼B**

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de experimente efectuate.

Rezultatele pozitive ale unui test de aberație cromozomială *in vivo* indică faptul că o substanță provoacă aberații cromozomiale în măduva osoasă a speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu provoacă aberații cromozomiale în măduva osoasă a speciei testate.

Ar trebui discutată probabilitatea ca substanța de testat sau metabolizii acesteia să ajungă în circulația generală sau în mod specific în țesutul-țintă (de exemplu toxicitatea sistemică).

### 3. **RAPORT**

#### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

##### *Solventul/vehiculul:*

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

##### Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrănire etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

##### Condițiile de testare:

- martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea căii de administrare selectate;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul-țintă, dacă este cazul;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apă de băut în doză reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;

**▼B**

- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;
- metodele de preparare a lamelelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

## Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- indexul mitotic;
- tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;
- numărul total de aberații pentru fiecare grupă împreună cu numărul mediu și deviațiile standard;
- numărul de celule cu aberații pentru fiecare grupă împreună cu numărul mediu al acestora și deviațiile standard;
- variațiile ploidiei, dacă există;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- datele privind martorii pozitivi studiați în paralel.

## Discutarea rezultatelor.

## Concluzii.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275-306.
2. Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
4. Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
5. Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

**▼B**

6. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.* 119, pp. 403-413.
8. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363-1364.

**▼B****B.12. MUTAGENITATEA – TESTUL *IN VIVO* DE MICRONUCLEU PE ERITROCITE DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 474 a OCDE, Testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Testul *in vivo* de micronucleu pe celule de mamifere se utilizează pentru detectarea leziunilor cromozomilor sau ale aparatului mitotic al eritroblastilor produse de substanța de testat; detectarea se realizează prin analiza eritrocitelor prelevate din măduva osoasă și din celulele sângelui periferic ale animalelor, de obicei, rozătoare.

Scopul testului de micronucleu este identificarea substanțelor care produc leziuni citogenetice ce determină formarea de micronuclee conținând fragmente de cromozomi sau cromozomi întregi întârziți.

Când un eritroblast din măduva osoasă evoluează într-un eritrocit policromatic, nucleul principal este expulzat; orice micronucleu care se formează poate să rămână în citoplasma anucleată. Micronucleele se vizualizează mai ușor în aceste celule cărora le lipsește nucleul principal. O creștere a frecvenței eritrocitelor policromatice micronucleate la animalele tratate indică producerea unei leziuni cromozomiale.

În prezentul test se utilizează în mod curent măduva osoasă a rozătoarelor deoarece eritrocitele policromatice se produc în acest țesut. Numărătoarea eritrocitelor (policromatice) imature micronucleate în sângele periferic este la fel de acceptabilă la toate speciile la care s-a demonstrat incapacitatea splinei de a elimina eritrocitele micronucleate sau care prezintă o sensibilitate specifică pentru detectarea agenților care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică. Există numeroase criterii care permit identificarea micronucleelor. Unul dintre acestea este identificarea prezenței sau absenței unui kinetocor sau a ADN centromeric în micronucleu. Frecvența eritrocitelor (policromatice) imature micronucleate este principalul criteriu. De asemenea, numărul de eritrocite (normocromatice) mature în sângele periferic care conține micronuclee printre un număr dat de eritrocite mature se poate utiliza ca un criteriu în cazul tratării animalelor timp de patru săptămâni sau mai mult.

Prezentul test *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere este relevant în special la evaluarea riscului mutagen, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de regenerare a ADN-ului, deși aceștia pot să varieze între specii, între țesuturi și între efectele genetice. Un test *in vivo* este, de asemenea, util pentru studierea suplimentară a unui efect mutagen detectat într-un sistem *in vitro*.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu atinge țesutul-țintă utilizarea prezentului test nu este potrivită.

A se vedea și introducerea generală partea B.

▼ B

## 1.2. DEFINIȚII

**Centromer (kinetocor):** porțiune sau porțiuni dintr-un cromozom care în timpul diviziunii celulare este legată cu fibrele fusului mitotic, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

**Micronuclee:** nuclee mici, separate de nucleeele principale ale celulelor și prezente în plus față de acestea, produse în timpul telofazei mitozei (meioză) de către fragmentele de cromozomi sau de cromozomii întregi întârziați.

**Eritrocit normocromatic:** eritrocit matur lipsit de ribozomi și care se poate distinge de eritrocitele policromatice imature cu ajutorul unor substanțe care colorează selectiv ribozomii.

**Eritrocit policromatic:** eritrocit imatur, aflat într-un stadiu intermediar de dezvoltare, care mai conține ribozomi și, prin urmare, se poate distinge de eritrocitele normocromatice mature cu ajutorul substanțelor care colorează selectiv ribozomii.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele sunt expuse la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. Dacă se utilizează măduva osoasă, animalele se sacrifică la momente potrivite după tratament, se extrage măduva osoasă, se prepară și se colorează lamelele (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Dacă se utilizează sângele periferic, acesta se colectează la momente potrivite după tratament, se depune pe lamele și se colorează (4) (8) (9) (10). Pentru studiile cu sânge periferic, celulele ar trebui să se recolteze cât se poate de repede după ultima expunere. Lamelele preparate se examinează pentru a depista prezența micronucleelor.

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.4.1. Pregătire

1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Dacă se utilizează măduvă osoasă, se recomandă șoareci și șobolani, deși se poate utiliza orice specie adecvată de mamifere. Când se utilizează sânge periferic, se recomandă șoareci. Cu toate acestea, se poate utiliza orice specie adecvată de mamifere, cu condiția să fie o specie la care s-a demonstrat incapacitatea splinei de a elimina eritrocitele micronucleate sau care prezintă o sensibilitate specifică pentru detectarea agenților care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere din sușe utilizate în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă, ce nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpostire și de hrănire*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.



**▼B****1.4.1.3. Pregătirea animalelor**

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim.

**1.4.1.4. Pregătirea dozelor**

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

**1.4.2. Condiții de testare****1.4.2.1. Solventul/vehiculul**

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

**1.4.2.2. Martorii**

Pentru fiecare sex și pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă micronuclee *in vivo* la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinatorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită de cea prin care se administrează substanța de testat cu o singură prelevare a probelor. În plus, se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

| Substanța                                   | Nr. CAS              | Nr. EINECS |
|---|----------------------|------------|
| metansulfonat de etil                       | 62-50-0              | 200-536-7  |
| N-etil-N-nitrozouree                        | 759-73-9             | 212-072-2  |
| mitomicină C                                | 50-07-7              | 200-008-6  |
| ciclofosfamidă<br>ciclofosfamidă monohidrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4  |
| trietilenmelamină                           | 51-18-3              | 200-083-5  |

**▼B**

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicul și manipulați în același fel ca grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea inter-animale și frecvența incidenței celulelor cu micronuclee, provenite de la martori anteriori. Dacă, pentru martorii negativi, se face o singură prelevare de probe, momentul cel mai potrivit pentru prelevarea probelor este momentul primei prelevări. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau publicate să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

Dacă se utilizează sânge periferic, se poate accepta o probă prelevată înainte de tratament în calitate de martor negativ, dar doar în studiile de scurtă durată pe sânge periferic (de exemplu 1-3 tratamente), când datele rezultate se situează între limitele estimate pe baza datelor anterioare privind martorul.

## 1.5. MOD DE LUCRU

### 1.5.1. Numărul și sexul animalelor

Fiecare grupă tratată și martor include minimum cinci animale analizabile din fiecare sex (11). Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceleași specii, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sexul corespunzător.

### 1.5.2. Modalitatea de tratare

Nu se poate recomanda un program de tratament standard (și anume unul, două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore). Probele provenite de la un studiu cu administrare prelungită a dozelor sunt acceptabile, atâta timp cât pentru studiul respectiv s-a demonstrat un efect pozitiv sau, pentru un studiu negativ, atâta timp cât s-a demonstrat toxicitatea sau s-a utilizat doza-limită și administrarea dozei a continuat până în momentul prelevării probelor. Pentru a facilita administrarea unui volum mare de material, substanțele de testat se pot administra și în doză fracționată, și anume două tratamente în aceeași zi, la un interval de câteva ore.

Testul se poate realiza în două moduri:

- (a) Substanța de testat se administrează animalelor într-o singură repriză. Probele de măduvă osoasă se prelevează de cel puțin două ori, prelevarea începând cel mai devreme la 24 de ore după tratament, fără să se prelungească mai mult de 48 de ore după tratament, cu intervale corespunzătoare între probe. Dacă prelevarea probelor se realizează mai devreme de 24 de ore după tratament, ar trebui să se justifice acest lucru. Probele de sânge periferic se prelevează cel puțin de două ori, dar nu mai devreme de 36 de ore după tratament, cu intervale corespunzătoare după prima probă și nu trebuie să depășească 72 de ore. Dacă la un moment de prelevare se înregistrează un rezultat pozitiv, prelevarea probelor încetează.

**▼B**

(b) Dacă se practică două sau mai multe tratamente zilnice (de exemplu două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore), ar trebui ca prelevarea probelor să se realizeze o dată la un interval de timp cuprins între 18 și 24 de ore după tratamentul final pentru măduva osoasă și o dată într-un interval de timp cuprins între 36 și 48 de ore după tratamentul final pentru sângele periferic (12).

Dacă este relevant, se pot utiliza și alte momente de prelevare a probelor.

### 1.5.3. Doze

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex și regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal (13). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la toxicitate maximă până la toxicitate minimă sau netoxicitate. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (cum ar fi hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în măduva osoasă (de exemplu o reducere a proporției de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite din măduva osoasă sau din sângele periferic).

### 1.5.4. Test-limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corporală, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. Pentru studiile pe termen lung, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi pentru un tratament de până la 14 zile și de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi pentru un tratament mai lung de 14 zile. În funcție de expunerea umană preconizată, s-ar putea să fie necesară o doză mai mare în testul-limită.

### 1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau a unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

**▼B****1.5.6. Prepararea măduvei osoase/a sângelui**

Celule de măduvă osoasă se extrag în mod curent din femur sau tibie imediat după sacrificare. De obicei, celulele se extrag din femur sau tibie, se depun pe lamele și se colorează prin metodele stabilite. Sângele periferic se obține din vena caudală sau alte vase de sânge corespunzătoare. Celulele sanguine se colorează imediat supravital (8) (9) (10) sau se întinde mai întâi pe lamele și apoi se colorează. Utilizarea unui colorant specific pentru ADN [de exemplu oranj de acridină (14), Hoechst 33258 plus pironină –Y (15)] poate să elimine unele din artefacte datorită utilizării unui colorant nespecific pentru ADN. Avantajul menționat nu exclude utilizarea coloranților convenționali (de exemplu Giemsa). Se pot utiliza și alte sisteme [de exemplu coloane de celuloză pentru eliminarea celulelor nucleate (16)], cu condiția ca sistemele respective să se fi dovedit eficiente pentru prepararea micronucleelor în laborator.

**1.5.7. Analiza**

Pentru fiecare animal se determină proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite (imature + mature) prin examinarea a cel puțin 200 de eritrocite pentru măduva osoasă și 1 000 de eritrocite pentru sângele periferic (17). Fiecare dintre lamele, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, ar trebui codificată independent, înainte de analiza microscopică. Se identifică minimum 2 000 de eritrocite imature per animal pentru a determina incidența eritrocitelor imature micronucleate. Prin identificarea eritrocitelor mature pentru depistarea micronucleelor se pot obține informații suplimentare. La examinarea lamelelor, proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite ar trebui să fie mai mare de 20 % față de valoarea martorilor. Dacă animalele sunt tratate în mod continuu timp de patru săptămâni sau mai mult, se pot identifica, de asemenea, cel puțin 2 000 de eritrocite mature per animal pentru a constata incidența micronucleelor. Sistemele de analiză automată (analiza imaginii și citometria de flux a suspensiilor de celule) se pot utiliza în locul evaluării manuale, dacă sunt validate și justificate corespunzător.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal analizat se consemnează în tabel numărul de eritrocite imature examinate, numărul de eritrocite imature micronucleate și numărul de eritrocite imature, în raport cu numărul total de eritrocite. Dacă animalele se tratează continuu timp de patru săptămâni sau mai mult, ar trebui să se prezinte și datele privind eritrocitele mature, dacă s-a făcut colectarea acestora. Pentru fiecare animal se prezintă proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite și, dacă se consideră că este cazul, procentul de eritrocite micronucleate. Dacă nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele de la ambele sexe se pot combina pentru analiza statistică.

**▼B****2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, cum ar fi o creștere în funcție de doză a numărului de celule micronucleate sau o creștere clară a numărului de celule micronucleate dintr-o grupă cu o doză unică la un singur moment de prelevare. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (18) (19). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor de testare.

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în cazuri rare datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile, independent de numărul de experimente.

Rezultatele pozitive ale testului de micronucleu indică faptul că substanța induce formarea de micronuclee ca urmare a leziunilor cromozomiale sau a leziunilor aparatului mitotic din eritroblaștii speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu produce micronuclee în eritrocitele imature ale speciei testate.

Ar trebui să fie discutată probabilitatea ca substanța de testat sau metabolismul acesteia să ajungă în circulația generală sau în mod specific în țesutul-țintă (de exemplu toxicitatea sistemică).

**3. RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare ar trebui să conțină următoarele informații:

*Solventul/vehiculul:*

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

*Animalele de laborator:*

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrănire etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

*Condițiile de testare:*

- martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;

**▼B**

- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea căii de administrare selectate;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul-țintă, dacă este cazul;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doză reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de preparare a lamelelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru numărătoarea eritrocitelor imature micronucleate;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

## Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite;
- numărul de eritrocite imature micronucleate, prezentat separat pentru fiecare animal;
- media  $\pm$  deviația standard pentru eritrocitele imature micronucleate pentru fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice și metodele aplicate;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel și anterior testului;
- datele privind martorii pozitivi studiați în paralel.
- Discutarea rezultatelor.
- Concluzii.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
2. Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
3. Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
4. Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.

## ▼B

5. MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.
6. MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
7. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
11. Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of  $30 \pm 6$  h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
13. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
14. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
15. MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
16. Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
17. Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.

**▼B**

18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part I, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
19. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.



**▼B****B.13/14. MUTAGENITATEA – TESTUL DE MUTAȚIE INVERSĂ PE BACTERII****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 471 a OCDE, Testul de mutație inversă pe bacterii (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Testul bacterian de mutație inversă se bazează pe sușe de *Salmonella typhimurium* și *Escherichia coli*, care necesită aminoacizi, și urmărește detectarea mutațiilor punctiforme, care includ substituția, adăugarea sau deleția uneia sau a câtorva perechi de bază din ADN (1) (2) (3). Principiul prezentului test bacterian de mutație inversă constă în detectarea mutațiilor care reîntorc mutațiile, prezente în sușele experimentale, în starea inițială și refac funcționalitatea bacteriilor de a sintetiza un aminoacid esențial. Bacteriile de inversare se detectează datorită capacității lor de a se dezvolta în absența aminoacidului necesar pentru sușa parentală experimentală.

Mutațiile punctiforme sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi substanțiale că mutațiile din oncogene și genele supresoare de tumori din celulele somatice sunt implicate în formarea tumorilor la oameni și animalele de laborator. Testul bacterian de mutație inversă este rapid, ieftin și relativ ușor de realizat. Multe dintre sușele experimentale au câteva particularități care le fac mai sensibile pentru detectarea de mutații, inclusiv secvențe de ADN sensibile la mutații în locurile de inversare, permeabilitate celulară crescută pentru moleculele mari și eliminarea sistemelor de regenerare a ADN sau intensificarea proceselor care au tendința să inducă erori în timpul regenerării ADN. Specificitatea sușelor experimentale poate să furnizeze informații utile privind tipurile de mutații care sunt induse de către agenții genotoxici. O bază de date cu un număr mare de rezultate, pentru structuri foarte variate, este disponibilă pentru testele bacteriene de mutații inverse și au fost elaborate metodologii bine stabilite pentru testarea produselor chimice cu diferite proprietăți fizico-chimice, inclusiv a compușilor volatili.

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Un test de mutație inversă**, fie la *Salmonella typhimurium*, fie la *Escherichia coli*, detectează mutația într-o sușă care necesită un aminoacid (histidină sau respectiv triptofan) pentru a produce o sușă independentă de aportul exterior de aminoacid.

**Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază** sunt agenți care provoacă substituirea unei baze din ADN. Într-un test de reversie, acest tip de modificare poate să se producă la locul mutației inițiale sau într-un al doilea loc în genomul bacterian.

**Mutageni de decalare a cadrului de citire** sunt agenți care produc adăugarea sau deleția uneia sau a mai multor perechi de bază din ADN, modificând astfel cadrul de citire în ARN.

## ▼B

## 1.3. CONSIDERAȚII PRELIMINARE

Testul bacterian de mutație inversă utilizează celule procariote, care diferă de celulele mamiferelor în privința absorbției, a metabolismului, a structurii cromozomilor și a proceselor de regenerare a ADN. Pentru testele realizate *in vitro* este necesară în general o sursă exogenă de activare metabolică. Sistemele de activare metabolică *in vitro* nu pot să reproducă în totalitate condițiile metabolismului celulelor de mamifere *in vivo*. Testul nu furnizează, prin urmare, informații directe privind capacitatea mutagenă și cancerigenă a unei substanțe la mamifere.

Testul bacterian de mutație inversă se utilizează, de obicei, pentru o primă triere a activității genotoxice, în special pentru detectarea mutației punctiforme. O bogată bază de date demonstrează că multe produse chimice care dau rezultate pozitive în prezentul test prezintă activitate mutagenă și în alte teste. Există exemple de agenți mutageni care nu se detectează prin acest test; aceste deficiențe se pot explica prin natura specifică a efectului detectat, activării metabolice diferite sau biodisponibilității diferite. Pe de altă parte, factorii care cresc sensibilitatea testului bacterian de mutație inversă pot să conducă la o supraestimare a activității mutagene.

S-ar putea ca testul bacterian de mutație inversă să nu fie potrivit pentru evaluarea anumitor clase de substanțe chimice, de exemplu compușii cu acțiune bactericidă puternică (de exemplu anumite antibiotice) sau cei despre care se consideră (sau se știe) că interferează în mod specific cu sistemele de replicare a celulelor de mamifere (de exemplu unii inhibitori de topoizomerază și unii analogi de nucleozide). În aceste cazuri, s-ar putea ca testele de mutație pe celule de mamifere să fie mai potrivite.

Deși mulți compuși care dau rezultate pozitive în prezentul test sunt cancerigene pentru mamifere, corelația nu este absolută. Aceasta depinde de clasa de substanțe chimice și există agenți cancerigeni care nu se detectează cu prezentul test, deoarece acționează prin alte mecanisme negenotoxice sau mecanisme care nu sunt prezente în celulele bacteriene.

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Suspensiile de celule bacteriene sunt expuse la substanța de testat în prezența și în absența unui sistem exogen de activare metabolică. În procedeul de încorporare prin depunere pe o placă, suspensiile menționate se amestecă cu o geloză de acoperire (agar) și se depun imediat pe un mediu minimal. În procedeul cu preincubare, amestecul de tratare se incubează și apoi se amestecă cu geloză de acoperire înaintea depunerii pe un mediu minim. Pentru ambele metode, după două sau trei zile de incubare, coloniile care produc inversarea se numără și numărul obținut se compară cu cel al coloniilor spontane de inversare aflate pe plăci cu martor tratate cu solvent.

Sunt descrise câteva proceduri pentru realizarea testului bacterian de mutație inversă. Printre cele utilizate în mod curent sunt metoda de încorporare prin depunere (1) (2) (3) (4), metoda cu preincubare (2) (3) (5) (6) (7) (8), metoda fluctuației (9) (10) și metoda cu suspensie (11). Sunt descrise modificări pentru testarea substanțelor în stare gazoasă sau de vapori (12).

## ▼B

În prezenta metodă se descrie modul de lucru pentru procedeul de încorporare prin depunere și pentru cel cu preincubare. Oricare dintre acestea se poate accepta pentru realizarea experimentelor, atât cu activare metabolică, cât și fără aceasta. Pentru unele substanțe, este mai eficientă detectarea prin procedeul cu preincubare. Substanțele respective aparțin unor clase chimice care includ nitrozamine alifactice cu lanț scurt, metale bivalente, coloranți azoici și diazoderivații, alcaloizi ai pirolizidinei, compuși alchilici și nitroderivați (3). De asemenea, se admite că unele clase de mutageni nu se detectează întotdeauna prin procedee standard, ca încorporarea prin depunere sau procedeul cu incubare. Ar trebui să se considere că acestea sunt „cazuri izolate” și se recomandă cu tărie utilizarea unor procedee alternative pentru detectarea lor. Din categoria „cazuri izolate” este posibilă identificarea (împreună cu exemple de procedeele care se pot utiliza pentru detectarea acestora) a următoarelor cazuri: coloranți azoici și compuși diazoici (3) (5) (6) (13), cei în stare gazoasă și volatili (12) (14) (15) (16) și glicozidele (17) (18). Orice deviație de la procedura standard necesită o justificare științifică.

## 1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.5.1. Pregătire

## 1.5.1.1. Bacteriile

Culturile proaspete de bacterii ar trebui lăsate să se dezvolte până la finalul fazei exponențiale sau debutul fazei staționare de creștere (aproximativ  $10^9$  celule pe ml). Culturile aflate în faza staționară finală nu ar trebui să se utilizeze. Este esențial ca în experiment să se utilizeze culturi cu titru mare de bacterii viabile. Titrul se poate determina, fie plecând de la datele anterioare privind curbele de creștere ale culturilor martor, fie pentru fiecare test, prin determinarea numărului de celule viabile prin etalare.

Temperatura de incubare recomandată este de 37 °C.

Se recomandă utilizarea a minimum cinci sușe de bacterii. Acestea ar trebui să includă patru sușe de *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 sau TA97a sau TA97; TA98 și TA100) pentru care comparațiile între laboratoare au indicat că sunt fiabile și dau răspunsuri reproductibile. Cele patru sușe de *S. typhimurium* menționate posedă perechi de bază GC în primul situs de reversie și se cunoaște că acestea nu pot să detecteze anumiți agenți mutageni oxidanți, agenți de reticulare și unele hidrazine. Detectarea acestor substanțe este posibilă cu ajutorul sușelor de *E. coli* WP2 sau de *S. typhimurium* TA102 (19) care posedă o pereche de bază AT în situsul primar de reversie. Combinația de sușe recomandată este, prin urmare, următoarea:

— *S. typhimurium* TA1535; și

— *S. typhimurium* TA1537 sau TA97 sau TA97a; și

— *S. typhimurium* TA98; și

— *S. typhimurium* TA100; și

— *E. coli* WP2 uvrA sau *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) sau *S. typhimurium* TA102.

Pentru detectarea agenților mutageni de reticulare s-ar putea prefera includerea sușei TA102 sau adăugarea unei sușe de *E. coli* capabile de regenerarea ADN [de exemplu *E. coli* WP2 sau *E. coli* WP2 (pKM101)].

## ▼B

Ar trebui să se utilizeze procedurile stabilite pentru prepararea culturilor de rezervă, verificarea markerilor și pentru păstrare. Pentru fiecare preparat de cultură de rezervă congelată, ar trebui să se demonstreze necesitatea prezenței unui aminoacid pentru dezvoltarea culturii (histidină pentru sușele *S. typhimurium* și triptofan pentru sușele *E. coli*). Ar trebui să se verifice și alte caracteristici ale fenotipului, de exemplu: prezența sau absența plasmidelor factorului R (rezistență), dacă este cazul [și anume rezistența la ampicilină a sușelor TA98, TA100, TA97a sau TA97, WP2 uvrA și WP2 uvrA (pKM101) și rezistența la ampicilină + tetraciclină a sușei TA102]; prezența mutațiilor caracteristice (și anume mutația rfa în *S. typhimurium* prin sensibilizare la cristal violet și mutația uvrA în *E. coli* sau mutația uvrB în *S. typhimurium* prin sensibilizare la lumina ultravioletă) (2) (3). De asemenea, sușele ar trebui să producă un număr de colonii spontane de reversie pe fiecare placă, între limitele de frecvență estimate pe baza datelor de laborator anterioare și, de preferință, între limitele semnalate în literatura de specialitate.

1.5.1.2. *Mediul*

Se utilizează o geloză minimală corespunzătoare (de exemplu una care conține mediu minimal E Vogel-Bonner și glucoză) și o geloză de acoperire care conține histidină și biotin sau triptofan pentru a permite divizarea doar a unui număr mic de celule (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activarea metabolică*

Expunerea bacteriilor la substanța de testat ar trebui să se realizeze atât în prezență, cât și în absența unui sistem corespunzător de activare metabolică. Sistemul utilizat cel mai frecvent conține o fracție post mitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (1) (2) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (18) (20) (21). Fracția postmitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între 5 și 30 % v/v în amestecul S9. Alegerea și compoziția unui sistem de activare metabolică pot să depindă de clasa chimică a substanței de testat. În unele cazuri, s-ar putea să fie convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale. Pentru coloranții azoici și diazoderivați, s-ar putea să fie mai potrivită utilizarea unui sistem de activare metabolică reducător (6) (13).

1.5.1.4. *Substanța de testat/Preparare*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului bacteriilor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele de testare și se diluează înainte de utilizare în tratamentul bacteriilor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

Solventul/vehiculul nu ar trebui să reacționeze chimic cu substanța de testat și nu ar trebui să afecteze supraviețuirea bacteriilor și activitatea S9 (22). Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos. Când se testează substanțe instabile în apă, solventul organic utilizat ar trebui să nu conțină apă.

**▼B****1.5.2. Condiții de testare****1.5.2.1. Sușele experimentale (a se vedea 1.5.1.1)****1.5.2.2. Concentrația de expunere**

Printre criteriile care trebuie luate în considerație la determinarea cantității maxime de substanță de testat ce urmează să utilizeze sunt citotoxicitatea și solubilitatea în amestecul final de tratare.

Ar putea fi util un test preliminar pentru determinarea toxicității și caracteristicilor de solubilitate. Detectarea citotoxicității poate fi posibilă printr-o reducere a numărului de colonii care provoacă reversia, o clarificare și diminuare a fondului de bacterii sau a gradului de supraviețuire a culturilor tratate. Prezența sistemelor de activare metabolică poate să influențeze citotoxicitatea unei substanțe. Insolubilitatea ar trebui să fie evaluată prin formarea în amestecul final, în condiții de testare reale, a unui precipitat vizibil cu ochiul liber.

Concentrația de testare maximă recomandată pentru substanțele necitotoxice solubile este de 5 mg/placă sau 5 μl/placă. Pentru substanțele necitotoxice insolubile la 5 mg/placă sau 5 μl/placă, una sau mai multe din concentrațiile de testare ar trebui să fie insolubile în amestecul final de tratament. Pentru substanțele de testat care sunt deja citotoxice la concentrații mai mici de 5 mg/placă sau 5 μl/placă, testarea ar trebui să se realizeze până la o concentrație citotoxică. Ar trebui ca precipitatul să nu interfereze cu evaluarea rezultatelor.

Într-un test inițial, se recomandă utilizarea unui număr minim de cinci concentrații analizabile diferite, cu intervale între punctele de testare de aproximativ o semiunitate logaritmică (și anume  $\sqrt{10}$ ). Pentru stabilirea unei relații concentrație – răspuns, intervale menționate mai reduse ar putea fi mai adecvate. Când se evaluează substanțe cu un conținut substanțial de posibile impurități mutagene, s-ar putea avea în vedere testarea la concentrații mai mari de 5 mg/placă sau 5 μl/placă.

**1.5.2.3. Martorii negativi și pozitivi**

Martorii pozitivi specifici sușei și martorii negativi (solvent sau vehicul) utilizați în paralel, ar trebui să se includă în fiecare test, atât în prezența, cât și în absența activării metabolice. Pentru martorii pozitivi, ar trebui să fie selectate acele concentrații care permit să se demonstreze eficiența testului realizat.

Pentru testele care utilizează un sistem de activare metabolică, selectarea substanței sau a substanțelor de referință pentru martorii pozitivi ar trebui să se realizeze în funcție de tipul sușelor bacteriene utilizate.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi pentru testele cu activare metabolică:

| Nr. CAS  | Nr. EINECS | Substanța                   |
|----------|------------|-----------------------------|
| 781-43-1 | 212-308-4  | 9,10-dimetilantracen        |
| 57-97-6  | 200-359-5  | 7,12-dimetilbenz[a]antracen |
| 50-32-8  | 200-028-5  | benzo[a]piren               |
| 613-13-8 | 210-330-9  | 2-aminoantracen             |

**▼B**

| Nr. CAS   | Nr. EINECS | Substanța                 |
|-----------|------------|---------------------------|
| 50-18-0   |            | ciclofosfamidă            |
| 6055-19-2 | 200-015-4  | ciclofosfamidă monohidrat |

Următoarea substanță este un martor pozitiv adecvat pentru metoda de activare metabolică reductivă:

|          |           |               |
|----------|-----------|---------------|
|          |           |               |
| 573-58-0 | 209-358-4 | Roșu de Congo |

2-aminoantracenul nu ar trebui să se utilizeze ca indicator unic al eficienței amestecului S9. Dacă se utilizează 2-aminoantracenul, fiecare lot de S9 ar trebui să fie, de asemenea, caracterizat cu un mutagen care necesită o activare metabolică de către enzimele microzomiale, de exemplu benzo[a]pirenul, dimetilbenzantracenul.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi specifici sușei pentru testele realizate fără un sistem de activare metabolică exogenă:

| Nr. CAS    | Nr. EINECS | Substanța                         | Sușa                             |
|------------|------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 26628-22-8 | 247-852-1  | azidă de sodiu                    | TA 1535 și TA 100                |
| 607-57-8   | 210-138-5  | 2-nitrofluoren                    | TA 98                            |
| 90-45-9    | 201-995-6  | 9-aminoacridină                   | TA 1537, TA 97 și TA 97a         |
| 17070-45-0 | 241-129-4  | ICR 191                           | TA 1537, TA 97 și TA 97a         |
| 80-15-9    | 201-254-7  | hidroperoxid de cumenă            | TA 102                           |
| 50-07-7    | 200-008-6  | mitomicin C                       | WP2 uvrA și TA 102               |
| 70-25-7    | 200-730-1  | N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidină | WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101) |
| 56-57-5    | 200-281-1  | 4-nitrochinolină-1-oxid           | WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101) |
| 3688-53-7  |            | furilfuramidă (AF2)               | sușe cu conținut de plasmid      |

Se pot utiliza și alte substanțe de referință ca martori pozitivi corespunzători. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă chimică, dacă sunt disponibili.

Ar trebui să se utilizeze martori negativi, constituiți din solvent sau vehicul fără substanța de testat, dar tratați în același mod ca grupele cu tratament. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul ales nu are efecte dăunătoare sau mutagene.

**▼B****1.5.3. Mod de lucru**

Pentru metoda de încorporare prin depunere pe o placă (1) (2) (3) (4), fără activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de soluție de testat, 0,1 ml de cultură bacteriană proaspătă (ce conține aproximativ  $10^8$  celule viabile) și 0,5 ml de tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire (agar). Pentru testul cu activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,5 ml preparat de activare metabolică, ce conține o cantitate specifică de fracție postmitocondrială (în proporție de 5 până la 30 % v/v în preparatul de activare metabolică), 2,0 ml de geloză de acoperire, bacterii și substanța de testat/soluția de testat. Conținutul din fiecare eprubetă se agită și se toarnă pe suprafața unui mediu minimal de geloză depus pe placă. Geloza de acoperire se lasă să se solidifice înainte de incubare.

Pentru metoda de preincubare (2) (3) (5) (6), substanța de testat/soluția de testat se supune la preincubare împreună cu sușa experimentală (ce conține aproximativ  $10^8$  celule viabile) și cu tamponul steril sau sistemul de activare metabolică (0,5 ml) de obicei timp de 20 de minute sau mai mult, la 30-37 °C, înainte de a fi amestecată cu geloză de acoperire și turnată pe suprafața unui mediu minimal de geloză depus pe placă. De obicei, se prepară un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de substanță de testat/soluție de testat, 0,1 ml bacterii și 0,5 ml amestec S9 sau tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire. Eprubetele ar trebui să fie aerate cu ajutorul unui agitator în timpul preincubării.

Pentru o bună estimare a variației, ar trebui să se utilizeze câte trei plăci cu depuneri pentru fiecare doză. Se acceptă utilizarea a doar două plăci cu depuneri, dacă se justifică științific acest lucru. Pierderea ocazională a unei plăci nu invalidează în mod necesar testul.

Substanțele în stare gazoasă sau cele volatile ar trebui să fie testate în condiții corespunzătoare, de exemplu în vase închise ermetic (12) (14) (15) (16).

**1.5.4. Incubarea**

Toată plăcile dintr-un test dat ar trebui să fie incubate la 37 °C timp de 48-72 de ore. După incubare, se procedează la număratoarea coloniilor care provoacă reversia de pe fiecare placă.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Datele ar trebui să se prezinte sub forma numărului de colonii care provoacă reversia de pe fiecare placă. De asemenea, ar trebui să se prezinte numărul de colonii care provoacă reversie, atât pe plăcile cu martor negativ (martor solvent și martor netratat, dacă s-a utilizat), cât și pentru plăcile cu martor pozitiv. Ar trebui să se prezinte număratoarea pentru fiecare placă, numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard pentru substanța de testat și pentru martorii pozitivi și negativi (netratați și solvent).

Nu este necesară verificarea unui răspuns clar pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință prin modificarea uneia dintre condițiile de testare. Rezultatele negative necesită confirmare pentru fiecare caz. În cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, ar trebui să se ofere o justificare. Pentru testele de confirmare ar trebui să se aibă în vedere modificarea condițiilor de testare pentru lărgirea gamei de condiții evaluate. Condițiile de testare care ar putea fi modificate includ diferența dintre concentrații, metoda de tratament (încorporarea prin depunere pe placă sau preincubarea în mediu lichid) și condițiile de activare metabolică.

**▼B****2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, precum creșterea în funcție de concentrație peste intervalul testat și o creștere reproductibilă a uneia sau mai multor concentrații ale numărului de colonii care provoacă reversia per placă, la cel puțin o sușă cu sau fără sistem de activare metabolică (23). În primul rând ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (24). Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile, independent de numărul de experimente.

Rezultatele pozitive ale unui test de mutație bacteriană inversă indică faptul că substanța de testat induce mutații punctiforme prin substituirea bazelor sau decalarea cadrului de citire în genomul de *Salmonella typhimurium* și/sau *Escherichia coli*. Rezultatele negative indică faptul că, în condiții de testare, substanța de testat nu este mutagenă pentru speciile testate.

**3. RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

*Solventul/vehiculul:*

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

*Sușele:*

- sușele utilizate;
- numărul de celule per cultură;
- caracteristicile sușei.

*Condițiile de testare:*

- cantitatea de substanță de testat per placă (mg/placă sau  $\mu$ l/placă) cu justificarea alegerii dozei și numărului de plăci per concentrație;
- mediile utilizate;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- procedurile de tratament.

*Rezultatele:*

- semnele de toxicitate;
- semnele de precipitare;
- numărătoarea pentru fiecare placă;



**▼B**

- numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel, cu domenii, valori medii și deviații standard;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați anterior, cu domenii, valori medii și deviații standard.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
2. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
4. Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
7. Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
9. Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.
10. Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

## ▼B

11. Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
13. Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
14. Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
15. Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
16. Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres *et al.* Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
21. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
23. Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.

**▼B**

24. Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

**▼B**

**B.15. TESTE DE MUTAGENEZĂ ȘI DE DEPISTARE A  
CANCEROGENEZEI MUTAȚIA GENICĂ –  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**1. METODĂ**

**1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Pentru a măsura producerea mutațiilor genice induse de agenți chimici, cu sau fără activare metabolică, pot fi folosite diverse sușe haploide și diploide ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*.

Au fost utilizate metode de producere a mutațiilor directe în sușe haploide, cum ar fi măsurarea transformării din mutanți roșii, care au nevoie de adenină (*ade-1*, *ade-2*), în mutanți albi cu nevoi duble de adenină, și metode selective cum ar fi inducerea rezistenței la canavaină și cicloheximidă.

Cel mai folosit sistem de mutație inversă validat presupune folosirea sușei haploide XV 185-14C, care conține mutații nonsens de codon *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* și *trp 5-48*, reversibile prin acțiunea agenților mutageni responsabili de substituția de bază, care induc mutații într-un situs specific sau mutații supresive de codon. Sușa XV 185-14C conține, de asemenea, markerul *his 1-7* cu o mutație cu sens greșit inversată, în special prin mutații în al doilea situs, și markerul *hom 3-10* care este inversat de agenți mutageni care conduc la decalarea cadrului de citire a codului genetic (*frameshift mutagens*).

Dintre sușele diploide de *Saccharomyces cerevisiae*, singura sușă folosită pe scară largă este D7, care este homozigotă pentru *ilv 1-92*.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE**

*Pregătire*

Soluțiile substanțelor de testare, precum și soluțiile martor trebuie să fie preparate imediat înaintea testării, utilizându-se un vehicul corespunzător. În cazul compușilor organici insolubili în apă, trebuie să se utilizeze soluții de cel mult 2 % v/v solvenți organici cum ar fi etanolul, acetona sau dimetilsulfoxidul (DMSO). Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze semnificativ viabilitatea celulară și caracteristicile de creștere.

**▼B****Activare metabolică**

Celulele trebuie expuse la substanțele de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen de activare metabolică.

Cel mai utilizat sistem este o fracțiune postmitocondrială suplimentată cu un cofactor preparat din ficatul de rozătoare tratate cu inductori enzimatici. Pentru activarea metabolică, pot fi folosite și alte specii, țesuturi, fracțiuni postmitocondriale sau alte metode.

*Condiții de testare***Sușe testate**

Sușele cel mai des utilizate în studiile de mutageneză sunt sușa haploidă XV 185-14C și sușa diploidă D<sub>7</sub>. Se pot utiliza și alte sușe.

**Medii de cultură**

Pentru stabilirea numărului de colonii supraviețuitoare și mutante sunt utilizate medii de cultură corespunzătoare.

**Utilizarea martorilor negativi și pozitivi**

Martorii pozitivi, cei netratați și cei tratați cu solvent trebuie preparați simultan. Pentru fiecare mecanism mutagen specific se folosesc substanțe martor pozitiv adecvate.

**Concentrația de expunere**

Trebuie folosite cel puțin cinci concentrații ale substanței de testat, cu intervale corespunzătoare între acestea. În cazul substanțelor toxice, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să reducă supraviețuirea la mai puțin de 5-10 %. Substanțele relativ insolubile în apă se testează până la limita de solubilitate, folosindu-se metode adecvate. Pentru substanțele netoxice cu un grad ridicat de solubilitate în apă, limita superioară a concentrației se determină de la caz la caz.

**Condiții de incubare**

Cutiile se incubează timp de 4-7 zile, la o temperatură de 28-30 °C, la întuneric.

**Frecvențele mutațiilor spontane**

Se folosesc subculturi celulare cu o frecvență a mutațiilor spontane în limitele normale admise.

**▼B****Numărul replicilor**

Pentru analiza prototrofilor produși prin mutagenază și a viabilității celulare se utilizează cel puțin trei replici pentru fiecare concentrație. În cazul experimentelor în care se utilizează markeri cum ar fi *hom* 3-10 cu o rată scăzută a mutațiilor, numărul replicilor trebuie să crească, astfel încât să se poată obține rezultate relevante din punct de vedere statistic.

**Mod de operare**

Tratamentul sușelor de *Saccharomyces cerevisiae* se realizează de obicei printr-o metodă de testare în lichid, care presupune utilizarea fie de celule staționare, fie de celule în creștere. Experimentele inițiale trebuie realizate pe celule în creștere:  $1-5 \times 10^7$  celule/ml sunt expuse la substanța chimică de testat pe o perioadă de 18 ore, la o temperatură de 28-37 °C, cu agitare; dacă este necesar, pe parcursul expunerii, se adaugă o cantitate corespunzătoare de sistem de activare metabolică. La sfârșitul tratamentului, celulele sunt centrifugate, spălate și însămânțate pe un mediu de cultură potrivit. După incubare, plăcile sunt inventariate în vederea stabilirii ratei de supraviețuire și a mutațiilor genice produse. Dacă primul experiment este negativ, trebuie realizat un al doilea experiment, folosind celule în fază staționară. Dacă primul experiment este pozitiv, acesta trebuie confirmat printr-un experiment independent adecvat.

**2. DATE**

Datele se prezintă într-un tabel, indicându-se numărul coloniilor, numărul mutanților, nivelul de supraviețuire și frecvența mutanților. Toate rezultatele trebuie confirmate printr-un experiment independent. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- sușele folosite;
- condițiile de testare: celule în faza staționară sau celule în creștere, compoziția mediilor de cultură, temperatura de incubare și durata acesteia, sistemul de activare metabolică;
- condițiile de tratament: niveluri de expunere, metoda și durata tratamentului, temperatura la care se realizează tratamentul, martori pozitivi și negativi;
- numărul coloniilor, numărul mutanților, nivelul de supraviețuire și frecvența mutanților, relația doză/răspuns (după caz), evaluarea statistică a datelor;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.16. RECOMBINAREA MITOTICĂ – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

La *Saccharomyces cerevisiae* se poate decela recombinația mitotică intergenică (sau, mai general, între o genă și centromerul său) și intragenică. Prima situație este denumită *crossing-over* mitotic și dă naștere unor schimburi reciproce de material genetic, în timp ce a doua situație, în care schimburile sunt, cel mai adesea, nereziproce, este denumită conversie genică. *Crossing-over*-ul se determină, în general, prin producerea de colonii homozigote recesive sau sectoare produse într-o sușă heterozigotă, în timp ce conversia genică se determină prin producerea de revertanți prototrofici într-o sușă auxotrofică heteroalelică, purtătoare a două alele defective diferite ale aceleiași gene. Sușele cele mai folosite la decelarea conversiei genice mitotice sunt D<sub>4</sub> (heteroalelică la *ade 2* și *trp 5*), D<sub>7</sub> (heteroalelică la *trp 5*), BZ<sub>34</sub> (heteroalelică la *arg 4*) și JD<sub>1</sub> (heteroalelică la *his 4* și *trp 5*). *Crossing-over*-ul mitotic care produce sectoare homozigote roșu și roz poate fi analizat în D<sub>5</sub> sau în D<sub>7</sub> (care măsoară, de asemenea, conversia genică mitotică și mutația inversă la *ilv 1-92*), ambele sușe fiind heteroalelice pentru alelele complementare ale *ade 2*.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE***Pregătire*

Soluțiile substanțelor chimice de testat și ale compușilor martor sau de referință trebuie preparate chiar înaintea testării, folosind un vehicul corespunzător. În cazul compușilor organici insolubili în apă, trebuie utilizate soluții de cel mult 2 % v/v de solvenți organici cum ar fi etanolul, acetona sau dimetilsulfoxidul (DMSO). Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze semnificativ viabilitatea celulară și caracteristicile de creștere.

*Activare metabolică*

Celulele trebuie să fie expuse la substanțele chimice de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen adecvat de activare metabolică. Sistemul folosit cel mai des este o fracțiune postmitocondrială suplimentată cu un cofactor preparat din ficatul de rozătoare tratate cu inductori enzimatici. Pentru activarea metabolică pot fi utilizate și alte specii, țesuturi, fracțiuni postmitocondriale sau alte metode.

**▼B***Condițiile de testare**Sușe testate*

Sușele cel mai frecvent utilizate sunt cele diploide D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>7</sub> și JD<sub>1</sub>. Pot fi utilizate și alte sușe.

*Medii de cultură*

Pentru a determina nivelul de supraviețuire și frecvența recombinărilor mitotice se utilizează medii de cultură adecvate.

*Utilizarea martorilor negativi și pozitivi*

Martorii pozitivi, cei netratați și cei tratați cu solvent, trebuie preparați simultan. Pentru fiecare tip specific de recombinare se folosesc substanțe martor pozitiv adecvate.

*Concentrații de expunere*

Trebuie realizate cel puțin cinci concentrații ale substanței de testat, cu intervale corespunzătoare între acestea. Printre factorii care trebuie luați în considerare se numără citotoxicitatea și solubilitatea. Concentrația minimă nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară. În cazul substanțelor toxice, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să reducă supraviețuirea la mai puțin de 5-10 %. Substanțele relativ insolubile în apă trebuie să fie testate până la limita solubilității, folosindu-se metode adecvate. În cazul substanțelor netoxice cu un grad ridicat de solubilitate în apă, limita superioară a concentrației se determină de la caz la caz.

Celulele pot fi expuse la substanțele chimice de testat fie în faza staționară, fie în faza creșterii, pentru perioade de până la 18 ore. În cazul perioadelor lungi de tratament, culturile trebuie studiate microscopic în vederea decelării formării sporilor, prezența acestora invalidând testul.

*Condiții de incubare*

Plăcile se incubează între 4 și 7 zile la o temperatură de 28-30 °C, la întuneric. Plăcile utilizate pentru determinarea sectoarelor homozigote roșu și roz produse prin crossing-over mitotic se păstrează în frigider la aproximativ 4 °C timp de una-două zile înaintea numărării, pentru a permite dezvoltarea de colonii pigmentate corespunzătoare.

*Frecvențele recombinării mitotice spontane*

Se utilizează subculturi cu o frecvență a mutațiilor spontane care se situează în limitele normale admise.



**▼B****Numărul replicilor**

Se utilizează cel puțin trei plăci pe concentrație pentru analiza prototrofilor produși prin conversia genică mitotică și pentru analiza viabilității. În cazul analizei homozigotismului recesiv produs prin crossing-over mitotic, numărul plăcilor trebuie să crească, astfel încât să furnizeze un număr corespunzător de colonii.

**Mod de operare**

Tratamentul sușelor de *Saccharomyces cerevisiae* se realizează de obicei printr-o metodă de testare în lichid, care presupune utilizarea fie de celule staționare, fie de celule în creștere. Experimentele inițiale trebuie realizate pe celule în creștere.  $1-5 \times 10^7$  celule/ml sunt expuse la substanța chimică de testat pe o perioadă de 18 ore, la o temperatură de 28-37 °C, cu agitare; după caz, pe parcursul tratamentului, se adaugă o cantitate corespunzătoare de sistem de activare metabolică.

La sfârșitul tratamentului celulele sunt centrifugate, spălate și înșămânțate pe un mediu de cultură potrivit. După incubare, plăcile sunt examinate în vederea stabilirii nivelului de supraviețuire și inducerea recombinării mitotice.

Dacă primul experiment este negativ, trebuie realizat un al doilea experiment în care se utilizează celule în fază staționară. Dacă primul experiment este pozitiv, acesta trebuie confirmat printr-un experiment independent corespunzător.

**2. DATE**

Datele se prezintă sub formă de tabele în care se indică numărul coloniilor numărate, numărul recombinanților, nivelul de supraviețuire și frecvența recombinanților.

Toate rezultatele trebuie confirmate printr-un experiment independent.

Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- sușele folosite;
- condițiile de testare: celule în faza staționară sau în faza de creștere, compoziția mediilor de cultură, temperatura de incubare și durata acesteia, sistemul de activare metabolică;
- condițiile de tratament: concentrațiile de expunere, procedura și durata tratamentului, temperatura la care se realizează tratamentul, martorii pozitivi și negativi;
- numărul coloniilor, numărul recombinanților, nivelul de supraviețuire și frecvența recombinării, relația doză/răspuns (după caz), evaluarea statistică a datelor;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**▼B**

## 3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.17. MUTAGENITATEA – TEST *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 476 a OCDE, Testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere se poate utiliza pentru detectarea mutațiilor genice produse de substanțele chimice. Liniile celulare corespunzătoare conțin celule de limfom de șoarece L5178Y, liniile CHO, CHO-AS52 și V79 de celule de hamster chinezesc și celule limfoblastoide umane TK6 (1). În liniile celulare menționate, efectele genetice cel mai frecvent măsurate sunt o mutație în pozițiile timidin kinază (TK) și hipoxantiginuanină fosforibozil transferază (HPRT), precum și o transgenă de xantin-guanină fosforibozil transferază (XPRT). Testele de mutație TK, HPRT și XPRT permit detectarea diferitelor spectre ale diferitelor fenomene genetice. Amplasarea autozomică a TK și XPRT poate să permită detectarea fenomenelor genetice (de exemplu deleții importante) care nu sunt detectate în locusul HPRT la cromozomii X (2) (3) (4) (5) (6).

În testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere, se pot utiliza culturi de linii celulare stabilite sau sușe celulare. Celule utilizate se selectează în funcție de capacitatea de creștere în cultură și de stabilitatea frecvenței de mutație spontană.

Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul de activare metabolică de acest tip nu poate să reproducă integral condițiile celulelor de mamifere *in vivo*. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea să conducă la obținerea unor rezultate care nu reflectă o mutagenitate intrinsecă. Rezultatele pozitive care reflectă o mutagenitate intrinsecă ar putea să provină în urma modificărilor de pH, de osmolalitate sau din valori mari ale citotoxicității (7).

Prezentul test se utilizează la depistarea substanțelor cu posibile efecte mutagene și cancerigene pentru mamifere. Mulți compuși care dau rezultate pozitive la acest test sunt cancerigeni pentru mamifere; cu toate acestea, nu există o corelație perfectă între prezentul test și cancerigenitate. Corelația depinde de clasa chimică și sunt tot mai multe dovezi cu privire la existența unor agenți cancerigeni care nu se depistează prin prezentul test, deoarece este posibil ca aceștia să acționeze prin alte mecanisme, negenotoxice sau mecanisme absente în celulele bacteriene (6).

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Mutație directă:** o mutație a genelor de la forma originală la forma mutantă care generează o reducere a activității enzimatică din funcția proteinei codificate.

**Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază:** substanțe care produc substituția uneia sau mai multor perechi de bază din ADN.

**Mutageni de decalare a cadrului de citire:** substanțe care produc adăugarea sau deleția uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

**▼B**

**Timpul de manifestare a fenotipului:** timpul în care produsele nemodificate ale genelor sunt epuizate din celulele care au suferit o nouă mutație.

**Frecvența mutantului:** numărul de celule mutante observate împărțit la numărul de celule viabile.

**Creștere totală relativă:** creșterea numărului de celule în timp, în raport cu populația de celule martor; se calculează ca produsul dintre creșterea în suspensie în raport cu martorul negativ și eficacitatea clonării în raport cu martorul negativ.

**Creștere relativă în suspensie:** creșterea numărului de celule în timpul de manifestare în raport cu martorul negativ.

**Viabilitate:** eficacitatea clonării celulelor tratate în momentul depunerii pe placă în condiții selective după perioada de manifestare.

**Supraviețuire:** eficacitatea clonării celulelor tratate atunci când sunt depuse pe placă la încheierea perioadei de tratament; supraviețuirea se exprimă în raport cu supraviețuirea populației de celule martor.

### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Celulele cu deficit de timidin chinază (TK) datorită mutației TK<sup>+/-</sup> → TK<sup>-/-</sup> sunt rezistente la efectele citotoxice ale trifluorotimidinei (TFT), un analog al pirimidinei. Celulele care posedă timidin chinază sunt sensibile la TFT, care produce inhibarea metabolismului celular și întrerupe diviziunea celulară. Prin urmare, celulele mutante pot să prolifereze în prezența TFT, în timp ce celulele normale, care conțin timidin chinază, nu pot. În mod similar, celulele cu deficit de HPRT sau XPRT sunt selectate în funcție de rezistența la 6-tioguanină (TG) sau 8-azaguanină (AG). Dacă analogul unei baze sau un compus înrudit cu agentul selectiv este supus la unul din testele de mutație genică pe celule de mamifere, proprietățile substanței de testat trebuie studiate cu grijă. De exemplu, ar trebui să se examineze substanța de testat suspectată de toxicitate selectivă pentru celule mutante și nemutante. În consecință, performanța sistemului/agentului de selecție trebuie să fie confirmată atunci când se testează substanțe chimice cu o structură apropiată de cea a agentului selectiv (8).

Celulele în suspensie sau în cultură monostrat se expun o perioadă de timp corespunzătoare la substanța de testat atât în prezență, cât și în absența activării metabolice și se reînsămânțează pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite manifestarea fenotipului înaintea selecției mutantului (9) (10) (11) (12) (13). Citotoxicitatea se determină, de obicei, prin măsurarea eficacității clonării relative (supraviețuirii) sau a creșterii totale relative a culturilor după perioada de tratament. Culturile tratate sunt menținute în mediul de cultură un timp suficient, caracteristic pentru fiecare locus și tip de celulă selectate, pentru a permite o manifestare fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse. Frecvența mutantilor se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta celulele mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența mutantului se determină prin compararea numărului de colonii de mutanți în mediul selectiv cu numărul de colonii în mediul neselectiv.

**▼B**

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Pregătire**1.4.1.1. *Celulele*

Există diferite tipuri de celule care se pot utiliza în prezentul test, inclusiv subclonele de celule L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 sau TK6. Tipurile de celule utilizate în prezentul test ar trebui să aibă o sensibilitate dovedită la mutageni chimici, o eficacitate mare de clonare și o frecvență de mutație spontană stabilă. Ar trebui să se verifice contaminarea cu micoplasmă a celulelor și, dacă se constată că sunt contaminate, nu ar trebui să se utilizeze.

Testul ar trebui conceput astfel încât să aibă o sensibilitate și putere predeterminate. Numărul de celule, culturi și concentrațiile substanței de testat utilizate ar trebui să reflecte parametrii definiți anterior (14). Numărul minim de celule viabile care supraviețuiesc tratamentului și se utilizează în fiecare stadiu al testului ar trebui să fie în funcție de frecvența mutației spontane. O regulă generală constă în utilizarea unui număr de celule cel puțin egal cu de 10 ori inversul frecvenței de mutație spontană. Cu toate acestea, se recomandă utilizarea a minimum  $10^6$  celule. Pentru a asigura o performanță constantă a testului, ar trebui să se dispună de date anterioare specifice privind sistemul celular utilizat.

1.4.1.2. *Mediile și condițiile de cultură*

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare (vasele de cultură, temperatura, concentrația  $\text{CO}_2$  și umiditatea) corespunzătoare. Alegerea mediilor ar trebui să se facă în funcție de sistemele selective și de tipul celulelor utilizate în test. O importanță deosebită o prezintă alegerea condițiilor de cultură, astfel încât să asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și capacitatea celulelor, atât mutante, cât și nemutante, de a forma colonii.

1.4.1.3. *Prepararea culturilor*

Celulele se obțin plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură și se incubează la 37 °C. Înainte de a fi utilizate în prezentul test, este necesară curățarea culturilor de celulele mutante preexistente.

1.4.1.4. *Activarea metabolică*

Se recomandă ca expunerea celulelor la substanța de testat să se realizeze atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică corespunzător. Sistemul cel mai frecvent utilizat este o fracție postmitocondrială la care s-au adăugat cofactori (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) sau un amestec de fenobarbitonă și  $\beta$ -naftoflavonă (19) (20).

Fracția post-mitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între limitele 1-10 % v/v în mediul de testare final. Selectarea și tipul unui sistem de activare metabolică poate să depindă de clasa chimică a substanței de testat. În unele cazuri, ar putea fi convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale.

**▼B**

O serie de realizări, inclusiv crearea prin inginerie genetică a unor linii celulare care exprimă enzime activatoare specifice, pot să furnizeze potențialul pentru o activare endogenă. Alegerea liniilor celulare ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific (de exemplu prin importanța izoenzimei citocromului P450 pentru metabolismul substanței de testat).

1.4.1.5. *Substanța de testat/Preparare*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului celulelor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele de testare și se diluează înainte de utilizare în tratamentul celulelor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora la păstrare.

1.4.2. **Condiții de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul ar trebui să fie ales astfel încât să nu existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat și să nu afecteze negativ supraviețuirea celulelor și activitatea S9. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să se justifice cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere un solvent/vehicul apos. La testarea substanțelor instabile în apă, solventul organic utilizat nu ar trebui să conțină urme de apă. Apa se poate elimina prin adăugarea unei site moleculare.

1.4.2.2. *Concentrațiile de expunere*

Printre criteriile ce trebuie să fie avute în vedere la determinarea dozei maxime sunt citotoxicitatea, solubilitatea în sistemul de testare și modificările de pH sau osmolalitate.

Citotoxicitatea ar trebui să se determine cu și fără activare metabolică în experimentul principal, utilizând un indicator corespunzător al integrității și dezvoltării celulare, ca eficacitatea clonării relative (supraviețuirea) sau creșterea totală relativă. Ar putea fi utilă determinarea citotoxicității și solubilității într-un experiment preliminar.

Ar trebui să se utilizeze cel puțin patru concentrații analizabile. Dacă o substanță este citototoxică, concentrațiile respective ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la maximă la mică sau lipsa toxicității; aceasta semnifică, de obicei, concentrații care ar trebui să fie separate printr-un factor cuprins între 2 și  $\sqrt{10}$  maximum. Dacă, datorită citotoxicității, concentrația este maximă, ar trebui să determine un procent de supraviețuire relativă (eficacitatea relativă a clonării) sau o creștere totală relativă de aproximativ 10-20 % (dar nu mai puțin de 10 %). Pentru substanțele relativ necitotoxice, concentrația de testare maximă ar trebui să fie cea mai mică dintre următoarele trei concentrații: 5 mg/ml, 5  $\mu$ l/ml sau 1,01 M.

**▼B**

Substanțele relativ insolubile ar trebui să fie testate la concentrații egale sau superioare limitei de solubilitate în condițiile de cultură. Insolubilitatea ar trebui să fie pusă în evidență în mediul final de tratament în care se expun celulele. Ar putea fi utilă evaluarea solubilității la începutul și la sfârșitul tratamentului, deoarece solubilitatea poate să varieze în timpul expunerii în sistemul de testare datorită prezenței celulelor, S9, serului etc. Insolubilitatea se poate constata cu ochiul liber. Ar trebui ca precipitarea să nu interfereze cu determinarea rezultatelor.

1.4.2.3. *Martorii*

În fiecare experiment, ar trebui să se includă simultan martorii pozitivi și negativi (solvent și vehicul), atât cu, cât și fără activare metabolică. În prezența activării metabolice, substanța utilizată ca martor pozitiv ar trebui să fie aceea care necesită activare pentru a da un răspuns mutagen.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe utilizate ca martori pozitivi:

| Tipul activării                       | Poziția                   | Substanța   | Nr. CAS   | Nr. EINECS |
|---------------------------------------|---------------------------|---|-----------|------------|
| Absența activării metabolice exogene  | HPRT                      | Metansulfonat de etil                             | 62-50-0   | 200-536-7  |
|                                       |                           | Etil nitrozouree                                  | 759-73-9  | 212-072-2  |
|                                       | TK (colonii mici și mari) | Metansulfonat de metil                            | 66-27-3   | 200-625-0  |
|                                       |                           |   |           |            |
|                                       | XPRT                      | Metansulfonat de etil                             | 62-50-0   | 200-536-7  |
|                                       |                           | Etil nitrozouree                                  | 759-73-9  | 212-072-2  |
| Prezența activării metabolice exogene | HPRT                      | 3-metilcolantren                                  | 56-49-5   | 200-276-4  |
|                                       |                           | N-nitrozodimetilamină                             | 62-75-9   | 200-549-8  |
|                                       |                           | 7,12-dimetilbenzantracen                          | 57-97-6   | 200-359-5  |
|                                       | TK (colonii mici și mari) | Ciclofosfamidă                                    | 50-18-0   | 200-015-4  |
|                                       |                           | Ciclofosfamidmonohidrat                           | 6055-19-2 |            |
|                                       |                           | Benzo[a]piren                                     | 50-32-8   | 200-028-5  |
|                                       |                           | 3-metilcolantren                                  | 56-49-5   | 200-276-5  |
|                                       | XPRT                      | N-nitrozodimetilamină (pentru valori mari ale S9) | 62-75-9   | 200-549-8  |
|                                       |                           | Benzo[a]piren                                     | 50-32-8   | 200-028-5  |
|                                       |                           |   |           |            |

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi, de exemplu se poate utiliza 5-bromo 2'-deoxiuridina (nr. CAS 59-14-3, nr. EINECS 200-415-9), dacă laboratorul dispune de o bază de date anterioare privind această substanță. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea ca martori pozitivi a unor substanțe din aceeași clasă chimică, dacă sunt disponibile.

**▼B**

Ca martori negativi ar trebui să se utilizeze solvenți sau vehicule singure în mediul de tratare, care se tratează în același condiții ca și culturile. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

#### 1.4.3. **Mod de lucru**

##### 1.4.3.1. *Tratamentul cu substanța de testat*

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp 3-6 ore este eficient). Timpul de expunere se poate prelungi cu unul sau mai multe cicluri celulare.

Fiecare concentrație se poate testa pe una sau pe două culturi tratate. Dacă se utilizează culturi unice, numărul concentrațiilor ar trebui să fie mai mare pentru a asigura un număr suficient de culturi pentru analiză (de exemplu minimum opt concentrații analizabile). Se recomandă utilizarea culturilor duble pentru martorul negativ (solvent).

Testarea substanțelor în stare gazoasă și a celor volatile ar trebui să se realizeze prin metode specifice, de exemplu în vase de cultură închise ermetic (21) (22).

##### 1.4.3.2. *Determinări de supraviețuire, viabilitate și frecvența mutantului*

La sfârșitul perioadei de expunere, celulele se spală și se cultivă în mediul de cultură pentru determinarea supraviețuirii și pentru a permite manifestarea fenotipului mutant. Determinarea citotoxicității începe, de obicei, după perioada de tratament și constă în măsurarea eficacității de clonare relativă (supraviețuirii) sau a creșterii totale relative a culturilor.

Fiecărui locus îi corespunde un timp minim definit, necesar pentru a permite manifestarea aproape optimă a fenotipului mutantilor nou induși (HPRT și XPRT necesită minimum 6-8 zile și TK minimum două zile). Pentru determinarea numărului de mutanți și a eficacității clonării, celulele sunt crescute în mediu cu și, respectiv, fără agent sau agenți selectivi. Măsurarea viabilității (utilizată la calcularea frecvenței mutantului) începe la terminarea perioadei de manifestare prin depunerea celulelor într-un mediu neselectiv.

Dacă substanța de testat dă un rezultat pozitiv la testul pe TK<sup>+/-</sup> L5178Y, dimensiunile coloniilor ar trebui să se determine pe minimum una dintre culturile experimentale (la concentrația pozitivă maximă) și pe martorii negativi și pozitivi. Dacă substanța de testat dă un rezultat negativ la testul pe TK<sup>+/-</sup> L5178Y, dimensiunile coloniilor ar trebui să se determine pe martorii negativi și pozitivi. Dimensiunile coloniilor se pot determina și în studiile în care se utilizează TK6TK<sup>+/-</sup>.



**▼B****2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Datele ar trebui să conțină determinarea citotoxicității și viabilității, numărul de colonii și frecvențele mutațiilor pentru culturile tratate și cele martor. Dacă se obține un răspuns pozitiv în testul pe TK<sup>+/-</sup> L5178Y, la numărătoarea coloniilor se face distincția între coloniile mici și mari pentru minimum o concentrație a substanței de testat (concentrația pozitivă maximă) și pentru martorul negativ și pozitiv. Ar trebui să se facă o examinare detaliată a naturii moleculare și citogenice a coloniilor mari și mici de mutații (23) (24). În testul pe TK<sup>+/-</sup>, numărătoarea coloniilor se realizează conform criteriului de creștere normală (mare) și creștere lentă (mică) a coloniilor (25). Celulele mutante care au suferit cele mai însemnate alterări genetice au timpi de duplicare prelungiți și formează, așadar, colonii mici. Această alterare variază, de obicei, de la pierderea întregii gene până la aberații cromozomiale care se manifestă în cariotip. Inducerea coloniilor mici de mutații este pusă pe seama substanțelor chimice care induc aberații cromozomiale însemnate (26). Celulele mutante mai puțin afectate se dezvoltă cu viteze similare cu cele ale celulelor originale și formează colonii mari.

Ar trebui să se prezinte datele privind supraviețuirea (eficacitatea clonării relative) sau creșterea totală relativă. Frecvența mutațiilor ar trebui să se exprime prin numărul de celule mutante împărțit la numărul de celule supraviețuitoare.

Ar trebui să se prezinte datele pentru fiecare cultură. În plus, toate datele ar trebui să se prezinte sub formă de tabel.

Nu este necesară verificarea unui răspuns pozitiv net. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință prin modificarea condițiilor de testare. Rezultatele negative necesită confirmare pentru fiecare caz. În cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, ar trebui să se ofere o justificare. Pentru testele de confirmare, atât a rezultatelor nesigure, cât și acelor negative, ar trebui să se aibă în vedere modificarea condițiilor de testare pentru lărgirea gamei de condiții evaluate. Parametrii care ar putea fi modificați includ diferența dintre concentrații și condițiile de activare metabolică.

**2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de concentrație sau o creștere reproductibilă a frecvenței mutațiilor. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice. Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în prezentul sistem.

**▼B**

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere indică faptul că substanța de testat produce mutații genice în celulele de mamifere, în cultură. Un rezultat concentrație-răspuns pozitiv reproductibil este foarte semnificativ. Rezultatele negative indică faptul că, în condiții de testare, substanța de testat nu produce mutații genice în celulele de mamifere utilizate, în cultură.

### 3. **RAPORT**

#### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

##### *Solventul/vehiculul:*

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

##### *Celulele:*

- tipul și sursa celulelor;
- numărul de culturi celulare;
- numărul de reînsămânțări, dacă este cazul;
- metodele de întreținere a culturilor celulare, dacă este cazul;
- absența micoplasmei.

##### *Condițiile de testare:*

- justificarea alegerii concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate, dacă sunt disponibile;
- compoziția mediului, concentrația CO<sub>2</sub>;
- concentrația substanței de testat;
- volumul vehiculului și al substanței de testat adăugate;
- temperatura de incubare;
- timpul de incubare;
- durata tratamentului;
- densitatea celulară în timpul tratamentului;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- martorii pozitivi și negativi;

**▼B**

- timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate și reînsămânțate, programele de alimentare, dacă este cazul);
- agenții selectivi;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure;
- metodele utilizate pentru numărătoarea celulelor viabile și mutante;
- definirea coloniilor pentru care se ține seama de dimensiuni și de tip (inclusiv criteriile pentru coloniile „mici” și „mari”, dacă este cazul).

## Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- semnele de precipitare;
- datele privind valoarea pH-ului și osmolalitatea în timpul expunerii la substanța de testat, dacă s-au determinat;
- dimensiunile coloniilor, dacă s-au determinat, cel puțin pentru martorii negativi și pozitivi;
- capacitatea laboratorului de a detecta mutații în colonii mici cu sistemul TK<sup>+/-</sup> L5178Y, dacă este cazul;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi utilizați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- frecvența mutațiilor.

## Discutarea rezultatelor.

## Concluzii.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.
3. Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.
4. Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

## ▼B

5. Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, pp. 121-128.
6. Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
9. Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.
10. Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
11. Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
12. Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
13. Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK+/- – TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
14. Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzacaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365-373.
16. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

## ▼B

17. Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.*, 59, pp. 61-108.
18. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
19. Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
22. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
23. Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
24. Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) and Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, pp. 161-174.
25. Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89-102.
26. Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.

**▼B****B.18. ALTERAREA ȘI REPARAREA ADN-ULUI – SINTEZA NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS – *UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS*) – TEST *IN VITRO* PE CELULE DE MAMIFERE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Testul de sinteză neprogramată a ADN (UDS) măsoară sinteza de reparare a ADN-ului după excizia și eliminarea unui fragment de ADN care conține regiunea alterată de agenți chimici și fizici. Testul se bazează pe încorporarea timidinei marcate cu tritium (timidină tritiată)  $^3\text{H-TdR}$  în ADN-ul celulelor de mamifere care nu sunt în faza S a ciclului celular. Încorporarea  $^3\text{H-TdR}$  se poate determina prin autoradiografiere sau prin LSC (*liquid scintillation counting*) a ADN-ului din celulele tratate. Cu excepția cazului când se folosesc hepatocite primare de șobolan, culturile de celule de mamifere se tratează cu substanța de testat cu și fără un sistem exogen de activare metabolică. UDS poate fi măsurată prin metode *in vivo*.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE***Pregătire*

Substanțele chimice de testat și substanțele martor sau substanțele de referință trebuie preparate în mediul de creștere ori dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat și ulterior diluate în mediul de cultură folosit în acest test. Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară.

În acest test pot fi folosite culturi celulare primare de hepatocite de șobolan, limfocite umane sau linii celulare bine caracterizate (de exemplu, fibroblaști diploizi umani).

Celulele trebuie tratate cu substanțele chimice de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică.

*Condițiile de testare***Numărul culturilor**

Pentru fiecare metodă de testare sunt necesare cel puțin două culturi celulare pentru autoradiografiere și șase culturi (sau mai puține, dacă există argumente științifice) pentru determinările prin LSC a UDS.

**▼B****Utilizarea martorilor negativi și pozitivi**

În fiecare experiment trebuie incluși simultan martori pozitivi și negativi (netratați și/sau vehicul) suplimentari, cu și fără activare metabolică.

În testele care folosesc hepatocite de șobolan, exemple de martori pozitivi sunt 7,12-dimetilbenzantracenul (7,12-DMBA) sau 2-acetilaminofluorenul (2-AAF). În cazul liniilor celulare bine caracterizate, 4-nitroquinolin-N oxid (4-NQO) este un exemplu de martor pozitiv care poate fi utilizat atât pentru autoradiografie, cât și pentru testele LSC efectuate fără activare metabolică; N-dimetilnitrozamina este un exemplu de compus care poate fi folosit ca martor pozitiv când se utilizează sisteme de activare metabolică.

**Concentrații de expunere**

Trebuie folosite mai multe concentrații ale substanței de testat, alese într-un interval adecvat pentru definirea răspunsului. Concentrația maximă trebuie să producă unele efecte citotoxice. Compușii relativ insolubili în apă trebuie testați până la limita superioară a solubilității. Pentru substanțele netoxice, ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației se stabilește de la caz la caz.

**Celule**

Mediile de creștere, concentrația de CO<sub>2</sub>, temperatura și umiditatea adecvate sunt necesare pentru menținerea culturilor. Liniile celulare bine caracterizate trebuie verificate periodic în vederea decelării contaminării cu Mycoplasma.

**Activare metabolică**

Pentru culturile primare de hepatocite nu se utilizează un sistem de activare metabolică. Liniile celulare bine caracterizate și limfocitele se tratează cu substanța de testat cu și fără un sistem adecvat de activare metabolică.

*Mod de operare***Pregătirea culturilor**

Liniile celulare bine caracterizate se obțin din culturi de sușe (prin tripsinizare sau descumare) cultivate cu o densitate corespunzătoare în vase de cultură și incubate la 37 °C.

Culturile pe termen scurt de hepatocite de șobolan se obțin permițând hepatocitelor proaspăt disociate într-un mediu adecvat să se fixeze pe suprafața de creștere.

Culturile de limfocite umane sunt produse prin tehnici adecvate.

**▼B****Tratarea culturilor cu substanța de testat****Hepatocite primare de șobolan**

Hepatocitele de șobolan proaspăt izolate se tratează cu substanța de testat într-un mediu ce conține  $^3\text{H}$ -TdR o perioadă de timp corespunzătoare. La sfârșitul perioadei de tratare, celulele trebuie filtrate, spălate, fixate și uscate. Lamele trebuie introduse în emulsia autoradiografică (alternativ, poate fi folosit un film fotografic), expuse, dezvoltate, colorate și numărate.

**Liniile celulare bine caracterizate și limfocitele**

Tehnica de autoradiografiere: Culturile celulare se tratează cu substanța de testat o perioadă de timp corespunzătoare, apoi se tratează cu  $^3\text{H}$ -TdR. Perioadele se stabilesc în funcție de natura substanței, de activitatea sistemelor metabolizante și de tipul celulelor. Pentru determinarea maximului de USD,  $^3\text{H}$ -TdR trebuie adăugată fie simultan cu substanța de testat, fie la câteva minute după expunerea la substanța de testat. Alegerea uneia dintre aceste metode se va face în funcție de interacțiunile posibile între substanța de testat și  $^3\text{H}$ -TdR. Pentru a putea face distincția între USD și replicarea semiconservativă a ADN, aceasta din urmă poate fi inhibată, de exemplu, prin utilizarea unui mediu sărac în arginină, cu conținut scăzut în ser sau prin adăugare de hidroxiuree în mediul de cultură.

Măsurarea USD prin LSC: Înainte de începerea tratamentului cu substanța de testat, se blochează intrarea celulelor în faza S în modul descris mai sus. Ulterior, celulele se tratează cu substanța de testat în conformitate cu descrierea pentru autoradiografie. La sfârșitul perioadei de incubare, ADN este extras din celule și se determină conținutul total de ADN și proporția de  $^3\text{H}$ -TdR încorporată.

Trebuie menționat faptul că dacă în tehnicile descrise mai sus se utilizează limfocite umane, nu este necesară suprimarea replicării semiconservative a ADN pe culturile nestimulate.

**Analiză*****Determinările autoradiografice***

Pentru determinarea USD în celulele din cultură, nucleeele de fază S nu se numără. Trebuie numărate minimum 50 celule per concentrație. Lamele trebuie etichetate înainte de numărare. De pe fiecare lamă se numără mai multe câmpuri distribuite aleatoriu, alese la distanță unul de celălalt. Cantitatea de  $^3\text{H}$ -TdR încorporată în citoplasmă se determină prin numărarea a trei arii de mărimea nucleului, din citoplasma fiecărei celule numărate.

**Determinările LSC**

Pentru determinarea prin LSC a USD se utilizează un număr adecvat de culturi pentru fiecare concentrație a substanței de testat și pentru martori.



**▼B**

Toate rezultatele trebuie confirmate într-un experiment independent.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate sub formă de tabele.

2.1. DETERMINĂRILE AUTORADIOGRAFICE

Cantitatea de  $^3\text{H}$ -TdR încorporată în citoplasmă și numărul de granulații găsite în nucleii celulari trebuie să fie înregistrate separat.

Pentru descrierea distribuției cantității de  $^3\text{H}$ -TdR încorporată în citoplasmă și numărul de granulații per nucleu se vor folosi media, mediana și modul șirului.

2.2. TEHNICA LSC

În tehnica LSC,  $^3\text{H}$ -TdR încorporată trebuie raportată folosind ca unitate de măsură dpm/ $\mu\text{g}$  ADN. Pentru descrierea distribuției încorporării se poate folosi media dpm/ $\mu\text{g}$  ADN cu deviația standard.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- celulele folosite, densitatea și numărul de pasaje celulare în momentul tratamentului, numărul de culturi celulare;
- metodele folosite pentru menținerea culturilor, inclusiv compoziția mediului, temperatura și concentrația de  $\text{CO}_2$ ;
- substanța de testat, vehiculul folosit, concentrațiile și argumentarea alegerii concentrațiilor folosite în experiment;
- informații despre sistemul de activare metabolică;
- schema de tratament;
- martorii pozitivi și negativi;
- tehnica de autoradiografie folosită;
- metodele folosite pentru a bloca intrarea celulelor în faza S;
- metodele folosite pentru extragerea ADN și determinarea conținutului total în ADN prin tehnica LSC;
- dacă este posibil, relația doză-efect;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**▼B**

## 3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.19. TEST *IN VITRO* DE SCHIMBARE A CROMATIDELOR SURORI (SCE)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

SCE este un test de scurtă durată de detectare a schimburilor reciproce de ADN între 2 cromatide surori ale unui cromozom în timpul duplicării. SCE reprezintă schimburile reciproce dintre produsele de replicare a ADN la loci aparent omologi. Se presupune că procesul de schimb implică ruperea și refacerea ADN-ului, însă datele existente despre bazele moleculare ale procesului sunt limitate. Detectarea SCE necesită câteva mijloace de marcarea diferențiată a cromatidelor surori, rezultat ce poate fi obținut prin încorporarea bromodeoxiuridinei (BrdU) în ADN-ul cromozomial pentru două cicluri celulare.

Celulele de mamifere sunt tratate *in vitro* cu substanța de testat cu și fără un sistem exogen de activare metabolică la mamifere, după caz, apoi sunt cultivate pe o perioadă de două cicluri de replicare într-un mediu ce conține BrdU. După tratarea cu un inhibitor de fus mitotic (de exemplu colchicină) pentru oprirea celulelor în stadiul de metafază al mitozei (c-metafaza), celulele sunt prelevate și se efectuează preparatele cromozomiale.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătire**

— Pentru acest test se pot folosi culturi celulare primare (limfocite umane) sau linii celulare bine caracterizate (de exemplu, celule ovariene de hamster chinezesc). Liniile celulare trebuie verificate pentru a decela contaminarea cu *Mycoplasma*.

— Trebuie folosite medii de cultură și condiții de incubare (de exemplu temperatură, vase de cultură, concentrația de CO<sub>2</sub> și umiditate) corespunzătoare.

— Substanțele de testat pot fi preparate în mediul de cultură sau dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat înainte de începerea tratamentului celulelor. Concentrația finală de vehicul în mediul de cultură nu trebuie să afecteze în mod semnificativ viabilitatea celulară sau rata de creștere, iar efectele asupra frecvenței SCE trebuie monitorizate printr-un solvent martor.

**▼B**

- Celulele se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen adecvat de activare metabolică la mamifere. Alternativ, dacă se folosesc celule cu activitate metabolică intrinsecă, trebuie să se cunoască intensitatea și natura acestei activități, astfel încât să fie corespunzătoare clasei de substanțe chimice testate.

#### 1.6.2. *Condiții de testare*

##### Numărul de culturi

Pentru fiecare punct experimental se folosesc cel puțin două culturi.

##### Utilizarea martorilor pozitivi și negativi

În toate testele se includ martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ pentru vehicul.

Exemple de substanțe ce pot fi folosite ca martori pozitivi:

- compuși cu acțiune directă:

- etilmetansulfonatul;

- compuși cu acțiune indirectă:

- ciclofosfamida.

După caz, se poate introduce un martor pozitiv suplimentar din aceeași clasă chimică cu substanța de testat.

##### Concentrații de expunere

Se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de testat, spațiate în mod adecvat. Concentrația maximă trebuie să producă un efect toxic semnificativ, permițând totuși producerea unei replicări celulare corespunzătoare. Substanțele relativ insolubile în apă trebuie testate până la limita superioară a solubilității prin metode adecvate. Pentru substanțele netoxice ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației substanței de testat se stabilește de la caz la caz.

#### 1.6.2. *Mod de operare*

##### Pregătirea culturilor

Liniile celulare bine caracterizate se obțin din culturile de tulpini (de exemplu, prin tripsinizare sau prin descuamare), cultivate în vase de cultură cu o densitate corespunzătoare și incubate la 37 °C. Pentru culturile unistratificate, numărul de celule pe cultură trebuie ajustat astfel încât în momentul prelevării culturile să nu fie confluente în proporție mai mare de 50 %. Ca alternativă, se pot folosi suspensiile de culturi celulare. Culturile de limfocite umane se pot obține din sânge heparinizat, prin tehnici adecvate și sunt incubate la 37 °C.

**▼B****T r a t a m e n t**

Celulele aflate în stadiul de creștere exponențială se tratează cu substanța de testat pe o perioadă de timp corespunzătoare, în majoritatea cazurilor fiind suficiente una sau două ore. Durata tratamentului poate fi extinsă în anumite cazuri până la două cicluri celulare complete. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă corespunzătoare se tratează cu substanța de testat atât în prezență, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele se spală abundant pentru îndepărtarea substanței de testat și se cultivă timp de două cicluri de replicare în prezența BrdU. Ca metodă alternativă, celulele pot fi tratate simultan cu substanța de testat și BrdU pentru întreaga perioadă de cultură de două cicluri celulare.

Culturile de limfocite umane trebuie tratate când sunt într-o stare semisincronă.

Celulele trebuie analizate în perioada celei de-a doua diviziuni după tratament, asigurând astfel expunerea la substanța chimică în cele mai sensibile stadii ale ciclului celular. Cu toate culturile la care s-a adăugat BrdU se va lucra la întuneric sau iluminare slabă de la o sursă incandescentă până în momentul prelevării celulelor, pentru reducerea la minim a fotolizei ADN-ului care conține BrdU.

**R e c o l t a r e a c e l u l e l o r**

Culturile se tratează cu un inhibitor de fus mitotic (de exemplu colchicină) cu 1-4 ore înainte de recoltarea celulelor. Fiecare cultură este recoltată și prelucrată separat în vederea obținerii preparatelor cromozomiale.

**P r e p a r a r e a ș i c o l o r a r e a c r o m o z o m i l o r**

Preparatele cromozomiale se obțin prin tehnici citogenetice standard. Colorarea lamelelor pentru evidențierea SCE se poate face prin mai multe tehnici (de exemplu, prin fluorescență plus metoda Giemsa).

**A n a l i z a**

Numărul de celule analizate depinde de frecvența spontană a SCE la martori. De obicei, cel puțin 25 de metafaze bine exprimate pe cultură sunt analizate în termeni de SCE. Lamele trebuie etichetate înainte de analiză. La limfocitele umane se analizează numai celulele care conțin 46 de centromeri. Pe liniile celulare bine caracterizate se analizează numai metafazele care conțin  $\pm 2$  centromeri din numărul modal. Trebuie precizat dacă marcarea joncțiunii centromerice este sau nu inventariată ca SCE. Rezultatele trebuie confirmate într-un experiment independent.

**2.****D A T E**

Datele se sistematizează în tabele. Pentru fiecare cultură tratată sau martor se menționează separat numărul de SCE pentru fiecare metafază și numărul de SCE pe cromozom pentru fiecare metafază.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

**▼B****3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- celulele folosite, metodele de menținere a culturilor celulare;
- condițiile de desfășurare a testului: compoziția mediului, concentrația de CO<sub>2</sub>, concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, temperatura de incubare, durata tratamentului, inhibitorul fuzului de diviziune celulară folosit, concentrația acestuia și timpul de tratament cu acesta, tipul de sistem folosit pentru activarea metabolică la mamifere, martorii pozitivi și negativi;
- numărul de culturi la fiecare punct experimental;
- detalii despre tehnica folosită pentru prepararea lamelor;
- numărul de metafaze analizate (datele vor fi redate separat pentru fiecare cultură în parte);
- numărul mediu de SCE per celulă și per cromozom (datele trebuie indicate separat pentru fiecare cultură în parte);
- criteriile pentru numărarea SCE;
- argumentarea alegerii dozelor;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.20. TEST DE LETALITATE RECESIVĂ ÎN RAPORT CU SEXUL  
LA *DROSOPHILA MELANOGASTER* (SLRL)****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Testul SLRL pe *Drosophila melanogaster* este un test care depistează incidența mutațiilor, atât a mutațiilor punctiforme, cât și a delețiilor mici, în liniile germinale ale insectelor. Acest test este un test de mutație directă prin care pot decela mutațiile în aproximativ 800 loci de pe cromozomul X, ceea ce reprezintă aproximativ 80 % din totalul de loci ai acestuia. Cromozomul X reprezintă aproximativ o cincime din întregul genom haploid.

Mutațiile cromozomului X la *Drosophila melanogaster* se exprimă fenotipic la masculi purtători ai genei mutante. Dacă mutația este letală în condiții de hemizigotism, prezența sa se deduce din absența unei generații de descendenți de sex masculin, din cele două care sunt normal produse de o femelă heterozigotă. Aceste determinări se fac prin intermediul unor cromozomi special marcați și dispuși.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE***Pregătire**Tulpini*

Pot fi folosiți masculi dintr-o tulpină de tip sălbatic bine caracterizată și femele care conțin cromozomul Muller-5. De asemenea, se pot folosi femele din alte tulpini marcate corespunzător cu cromozomi X cu inversiuni multiple.

*Substanța de testat*

Substanțele trebuie dizolvate în apă. Substanțele insolubile în apă pot fi dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat (de exemplu, un amestec de etanol și Tween-60 sau 80), apoi diluate cu apă sau soluție salină înainte de administrare. Se recomandă evitarea folosirii ca vehicul a dimetilsulfoxidului (DMSO).

**▼B****Numărul de animale**

Sensibilitatea și puterea testului sunt determinate. Frecvența mutațiilor spontane observate la martorul corespunzător influențează puternic numărul de cromozomi tratați care trebuie analizați.

**Calea de administrare**

Expunerea se poate face pe cale orală, prin injectare sau expunere la gaze sau vapori. Administrarea substanței de testat prin hrană se poate face în soluții zaharoase. Dacă este necesar, substanța poate fi dizolvată într-o soluție de NaCl 0,7 % și injectată în torace sau abdomen.

**Utilizarea martorilor pozitivi și negativi**

În fiecare experiment trebuie folosiți martori negativi (pentru vehicul) și pozitivi. Cu toate acestea, dacă sunt disponibile date istorice pertinente despre martori, nu este necesară folosirea simultană a acestora.

**Niveluri de expunere**

Se folosesc trei niveluri de expunere. Pentru o evaluare preliminară se poate folosi un singur nivel de expunere, acesta fiind fie concentrația maximă tolerată, fie nivelul de concentrație care produce câteva semne de toxicitate. Pentru substanțele netoxice se face expunerea la concentrația maximă care poate fi obținută practic.

***Mod de operare***

Masculii din tulpinile sălbatice (în vârstă de trei-cinci zile) se tratează cu substanța de testat, apoi sunt împerecheați individual cu un număr în exces de femele virgine din tulpina Muller-S sau dintr-o altă tulpină marcată corespunzător (cu multiple inversiuni ale cromozomilor X). La fiecare două-trei zile femelele trebuie înlocuite cu alte femele virgine pentru a acoperi întregul ciclu al celulelor germinale. Descendenții acestor femele trebuie inventariați pentru depistarea efectelor letale corespunzătoare efectelor asupra spermatozoidelor maturi, spermatidelor în stadiu intermediar și tardiv, spermatidelor în stadiu timpuriu, spermatocitelor și spermatogoniilor din timpul tratamentului.

Femelele F<sub>1</sub> heterozigote din împerecherea de mai sus vor fi împerecheate individual (de exemplu, o femelă per fiolă) cu frații lor. În generația F<sub>2</sub> fiecare cultură este inventariată pentru a depista absența masculilor din tulpinile sălbatice. Dacă o cultură provine dintr-o femelă F<sub>1</sub> purtătoare de genă letală în cromozomul X parental (de exemplu, nu se observă masculi cu cromozomul tratat), fiicele acestei femele cu același genotip trebuie testate pentru a se constata dacă gena letală se repetă în generația următoare.

**2.****DATE**

Datele se sistematizează în tabele în care se specifică numărul de cromozomi X testați, numărul de masculi nefertili și numărul de cromozomi letali la fiecare concentrație de expunere și pentru fiecare perioadă de împerechere, pentru fiecare mascul tratat. Trebuie raportat numărul de clustere de diferite dimensiuni per mascul. Aceste rezultate trebuie confirmate într-un experiment separat.



**▼B**

Pentru evaluarea SLRL se vor folosi metode statistice adecvate. Trebuie luată în considerare aglomerarea de gene letale recesive provenite de la un singur mascul, care trebuie evaluată cu metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- tulpina: tulpinile sau liniile de *Drosophila* folosite, vârsta insectelor, numărul de masculi tratați, numărul de masculi sterili, numărul de culturi F<sub>2</sub> obținute, numărul de culturi F<sub>2</sub> fără descendenți, numărul de cromozomi purtători de genă dominantă letală detectați în fiecare stadiu al celulei germinale;
- criteriile de stabilire a dimensiunilor lotului tratat;
- condițiile de testare: descrierea detaliată a tratamentului și schema prelevării probelor, nivelul de expunere, date de toxicitate, martori negativi (solvent) și pozitivi, după caz;
- criteriile pentru numărarea mutațiilor letale;
- dacă este posibil, relația expunere/efect;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

3.2. **EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.21. TEST *IN VITRO* DE TRANSFORMARE A CELULELOR DE MAMIFERE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Pentru determinarea modificărilor fenotipice *in vitro* induse de substanțele chimice asociate cu transformări maligne *in vivo*, se folosesc sisteme de cultură de celule de mamifere. Cele mai des utilizate celule sunt C3H10T<sub>1/2</sub>, 3T3, SHE și celule de la șobolani Fisher. Testele urmăresc modificările în morfologia celulară, formarea de focare sau modificări în dependența de ancorare pe agar-agar semisolid. Există sisteme folosite mai rar care depistează alte modificări celulare morfologice sau fiziologice în urma expunerii la substanțe chimice cancerigene. Niciunul din mecanismele testate *in vitro* nu are o legătură mecanică determinată cu cancerul. Anumite sisteme de testare pot detecta promotori tumoralii. Citotoxicitatea poate fi determinată prin măsurarea efectelor materialului testat asupra capacităților de formare de colonii (eficiența de clonare) sau asupra ratei de creștere a culturilor. Măsurarea citotoxicității are rolul de a stabili dacă expunerea la substanța chimică testată are relevanță toxicologică, dar nu poate fi folosită pentru a calcula frecvența transformărilor în toate testele, deoarece unele dintre acestea pot necesita incubare prelungită și/sau reînsămânțare.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE***Pregătire***Celule**

În funcție de testul de transformare folosit, sunt disponibile diferite linii celulare sau celule primare. Cercetătorul trebuie să se asigure că celulele folosite în cadrul testului manifestă modificări fenotipice corespunzătoare după expunerea la un agent cancerigen cunoscut și că testul efectuat are o validitate și o fiabilitate demonstrate și documentate.

**Mediu**

Se utilizează medii și condiții de testare corespunzătoare testului de transformare efectuat.

**▼B****Substanța de testat**

Substanțele testate pot fi preparate în mediile de cultură sau dizolvate ori suspensionate într-un vehicul adecvat, înainte de tratarea celulelor. Concentrația finală a vehiculului în sistem nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară, rata de creștere sau incidența transformărilor.

**Activarea metabolică**

Celulele sunt expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. Dacă se utilizează un tip de celule cu activitate metabolică intrinsecă, natura acestei activități va fi recunoscută ca fiind adecvată clasei de substanțe chimice testate.

*Condiții de testare***Utilizarea martorilor pozitivi și negativi**

În fiecare experiment se includ martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ (pentru vehicul).

Printre exemplele de substanțe ce pot fi folosite ca martor pozitiv se numără:

— compuși cu acțiune directă:

— etilmetansulfonatul,

—  $\beta$ -propiolactona;

— compuși care necesită activare metabolică:

— 2-acetilaminofluoren,

— 4-dimetilaminoazobenzen,

— 7,12-dimetilbenzantracen.

Dacă este necesar, poate fi inclus un martor pozitiv suplimentar care să aparțină aceleiași clase de substanțe ca și substanța de testat.

**Concentrații de expunere**

Se folosesc mai multe concentrații ale substanței de testat. Acestea trebuie să prezinte efect toxic în funcție de concentrație, concentrația maximă determinând un nivel scăzut de supraviețuire, iar supraviețuirea la concentrația minimă fiind aproximativ aceeași cu cea de la martorul negativ. Pentru substanțele relativ insolubile în apă trebuie testată limita superioară a solubilității, folosind procedee corespunzătoare. Pentru substanțele netoxice, foarte ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației se stabilește de la caz la caz.

**▼B***Mod de operare*

Celulele se tratează o perioadă corespunzătoare, în funcție de sistemul de testare utilizat, acest lucru putând presupune reevaluarea dozei prin schimbarea mediului (și, după caz, un amestec de activare metabolică proaspăt) dacă expunerea este prelungită. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă suficientă sunt expuse la substanța de testat atât în prezență, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele trebuie spălate, îndepărtând substanța de testat, și cultivate în condiții adecvate pentru apariția modificărilor fenotipice urmărite și pentru stabilirea incidenței de transformare. Toate rezultatele trebuie confirmate în cadrul unui experiment independent.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele și pot avea diferite forme în funcție de metoda folosită, ca, de exemplu, numărarea plăcilor, plăci pozitive sau număr de celule transformate. După caz, supraviețuirea se exprimă ca procent din nivelul de supraviețuire la probele martor, iar frecvența de transformare ca raport între numărul de celule transformate și numărul de celule supraviețuitoare. Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- tipul de celule folosite, numărul de culturi celulare, metoda de menținere a culturilor;
- condițiile de testare: concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, timpul de incubare, durata și frecvența tratamentului, densitatea celulară pe parcursul tratamentului, tipul de sistem exogen folosit pentru activarea metabolismului, martorii pozitivi și negativi, caracteristicile fenotipului monitorizat, tipul de sistem selectiv folosit (după caz), argumentarea alegerii dozelor;
- metoda folosită pentru exprimarea numărului de celule viabile și transformate;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

3.2. **EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.22. TESTUL DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Efectele letalității dominante determină moartea embrionului sau a fătusului. Inducerea genelor letalității dominante prin expunere la o substanță chimică indică faptul că acea substanță a acționat la nivelul țesutului germinal al speciei testate. Este cunoscut faptul că letalitatea dominantă se datorează unei anomalii cromozomiale (numerice și structurale). Moartea embrionului, în cazul în care femelele sunt tratate, se poate datora și efectelor toxice.

În general, masculii se tratează cu substanța de testat și se împerechează cu femele virgine netratate. Pot fi studiate separat diferitele stadii ale celulelor germinale, la intervale de împerechere succesive. Creșterea numărului de ovule fecundate moarte per femelă în lotul tratat comparativ cu femelele din lotul martor reflectă posibilitatea pierderii sarcinii după implantare. Pierderile înaintea ovoimplantației pot fi estimate luând în considerare numărul de *corpora lutea* sau comparând numărul total de implanturi per femelă în lotul tratat și în lotul martor. Efectul total de letalitate dominantă reprezintă suma pierderilor înainte și după implantare. Calcularea efectului total al letalității dominante se bazează pe comparația dintre implanturile viabile la femelele din lotul tratat și la cele din lotul martor. Reducerea numărului de implanturi la anumite intervale de timp poate fi rezultatul distrugerii celulelor (a spermatocitului și/sau a spermatogoniei).

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE***Pregătire*

Dacă este posibil, substanțele folosite se dizolvă sau se suspensează într-o soluție izotonică salină. Substanțele chimice insolubile în apă pot fi dizolvate sau suspensionate în vehicule corespunzătoare. Vehiculul folosit nu trebuie să interfereze cu substanța chimică de testat și nici nu trebuie să producă efecte toxice. Pentru testarea chimică, se folosesc substanțe chimice de testat proaspete.

**▼B***Condiții de testare**Calea de administrare*

De regulă, compusul de testat trebuie administrat o singură dată. În funcție de informațiile toxicologice, se poate utiliza o schemă de tratament repetat. Căile normale de administrare sunt: intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare corespunzătoare.

*Animale de experiență*

Se recomandă utilizarea șobolanilor sau a șoarecilor. Animalele sănătoase și mature din punct de vedere sexual se repartizează aleatoriu în loturile tratate și în loturile martor.

*Numărul și sexul animalelor*

Se utilizează un număr corespunzător de masculi tratați, luând în considerare variația spontană a caracterelor biologice evaluate. Numărul se stabilește în funcție de sensibilitatea detectării și de gradul de încredere care au fost predeterminate. De exemplu, în cadrul unui test tipic, numărul masculilor din fiecare lot tratat trebuie să fie suficient pentru a asigura între 30 și 50 de femele gestante în fiecare perioadă de împerechere.

*Utilizarea martorilor negativi și pozitivi*

În general, în fiecare experiment se utilizează simultan martori pozitivi și negativi. Când experimente efectuate recent în același laborator oferă rezultate acceptabile cu privire la martorii pozitivi, aceste rezultate pot fi folosite ca martori pozitivi în experimentul curent. Substanțele martor pozitiv trebuie folosite la o doză scăzută corespunzătoare (de ex: MMS, intraperitoneal într-o doză de 10 mg/kg) pentru a demonstra sensibilitatea testului.

*Doze*

În mod normal, se utilizează trei doze de tratament. Doza mare trebuie să producă efecte toxice sau să reducă fertilitatea animalelor tratate. În anumite cazuri, este suficientă folosirea unei singure doze mari.

*Test-limită*

Substanțele care nu sunt toxice se testează la doza de 5 g/kg în cazul unei singure administrări sau 1 g/kg/zi în cazul administrărilor repetate.

*Mod de operare*

Sunt disponibile mai multe scheme de tratament. Cea mai frecventă este aceea a administrării unice a substanței de testat. Pot fi folosite și alte scheme de tratament.

Fiecare mascul se împerechează pe rând cu una sau două femele virgine netratate, la intervale corespunzătoare după tratament. Femelele sunt lăsate împreună cu masculii pe durata ciclului estral sau până la confirmarea împerecherii (prezența spermei în vagin sau a dopului vaginal).

**▼B**

Numărul împerecherilor după tratament se stabilește în funcție de schema de tratament și trebuie să asigure prelevarea de celule germinale în toate stadiile de dezvoltare a acestora.

Femelele sunt sacrificate în cea de-a doua jumătate a gestației, iar conținutul uterului se examinează în vederea decelării numărului de implanturi viabile și a numărului de implanturi neviabile. Ovarele se examinează pentru stabilirea numărului de *corpora lutea*.

## 2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele și prezintă numărul masculilor, al femelelor gestante și cel al femelelor negestante. Rezultatele fiecărei împerecheri, inclusiv identitatea fiecărui mascul și a fiecărei femele se înregistrează individual. În cazul fiecărei femele se menționează săptămâna de împerechere, doza administrată masculilor și numărul implanturilor vii și moarte.

Calcularea efectului total de letalitate dominantă se bazează pe comparația dintre implanturile vii, pentru fiecare femelă din cadrul lotului tratat și a implanturilor vii pentru fiecare femelă din cadrul lotului martor. Raportul dintre numărul implanturilor vii și moarte în lotul tratat se compară cu raportul din lotul martor și este analizat pentru a evidenția moartea produsului de concepție în faza post-implantare.

Dacă datele sunt înregistrate ca mortalitate precoce și mortalitate tardivă, din tabele trebuie să rezulte clar acest lucru. De asemenea, trebuie înregistrate pierderile în faza de preimplantare. Pierderile în faza de preimplantare se pot calcula în funcție de diferența dintre numărul de *corpora lutea* și numărul implanturilor sau urmărind reducerea numărului mediu de implanturi per uter la lotul tratat în comparație cu împerecherile martor.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

## 3. **RAPORT**

### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- specia, linia, vârsta și greutatea animalelor, numărul animalelor pe sexe folosite atât în lotul tratat, cât și în lotul martor;
- substanța de testat, vehiculul, dozele testate și argumentarea selectării dozelor, substanțe folosite ca martor negativ și pozitiv, datele cu privire la toxicitate;
- calea de administrare și schema de tratament;
- schema de împerechere;
- metoda folosită pentru confirmarea împerecherii;
- momentul sacrificării;
- criteriul de inventariere a efectelor de letalitate dominantă;
- relația doză/răspuns;

**▼B**

— evaluarea statistică a rezultatelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.



**▼B****B.23. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 483 a OCDE, Testul de aberație cromozomială pe spermatogonii de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Scopul testului *in vivo* de aberație cromozomială pe spermatogonii de mamifere constă în identificarea acelor substanțe care produc aberații cromozomiale ale structurii în celulele spermatogoniale ale mamiferelor (1) (2) (3) (4) (5). Aberațiile de structură pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. Prezenta metodă nu este destinată determinării aberațiilor numerice și, în general, nu se utilizează în acest scop. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane.

Prezentul test determină fenomenele cromozomiale din celulele germinale spermatogoniale și, prin urmare, ar trebui să permită estimarea mutațiilor transmisibile produse în celulele germinale.

Pentru test se utilizează, în general, rozătoare. Prezentul test citogenetic *in vivo* permite detectarea aberațiilor cromozomiale din mitozele spermatogoniale. Alte celule țintă nu fac obiectul prezentului test.

Pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidic din celulele spermatogoniale, ar trebui să se examineze prima diviziune celulară mitotică după tratament, înainte ca leziunile respective să se piardă în diviziunile celulare ulterioare. Prin analiza cromozomilor meiotici pentru detectarea aberațiilor de tip cromozomial în diakineză-metafaza I când celulele tratate se transformă în spermatoците, se pot obține informații suplimentare referitoare la celulele germinale spermatogoniale tratate.

Prezentul test *in vivo* este destinat să verifice dacă mutagenii sunt la fel de activi în celulele germinale ca și în celulele somatice. În plus, testul pe spermatogonii este relevant în evaluarea riscului de mutagenitate, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de regenerare a ADN.

Testiculele conțin un număr de generații de spermatogonii care prezintă sensibilități diferite la tratamentul chimic. Astfel, aberațiile detectate reprezintă un răspuns global al populațiilor de celule spermatogoniale tratate, în care predomină celulele spermatogoniale diferențiate, mai numeroase. În funcție de poziția în testicul, diferitele generații de spermatogonii pot să fie sau să nu fie expuse la substanțele prezente în circulația generală, datorită barierei fizice și fiziologice de celule Sertoli și a barierei sânge-testicul.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu vor ajunge la țesutul țintă, nu este indicată utilizarea prezentului test.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Aberație de tip cromatidic:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea cromatidelor singure sau prin divizarea și reuniunea între cromatide.

**Aberație de tip cromozomial:** o leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin divizarea sau divizarea și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

**Lacună:** leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

**Aberație numerică:** modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru animalele utilizate.

**Poliploidie:** multiplicare a numărului ( $n$ ) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (și anume  $3n$ ,  $4n$  etc.).

**Aberație structurală:** modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele se expun la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt sacrificate în momente corespunzătoare după tratament. Înainte de sacrificare, animalele se tratează cu o substanță de inhibare a metafazei (de exemplu colchicină sau Colcemid®). Apoi, din celulele germinale, se realizează preparate cromozomiale care se colorează, iar celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.4.1. Pregătire

1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Se utilizează, de obicei, hamsteri chinezești și șoareci de sex masculin. Cu toate acestea, se pot utiliza masculi din orice altă specie de mamifere adecvată. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase, din sușe utilizate în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă, ce nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpostire și de hrănire*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele de sex masculin, adulte, tinere, sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului.

**▼B****1.4.1.4. Prepararea dozelor**

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

**1.4.2. Condiții de testare****1.4.2.1. Solventul/vehiculul**

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehiculi decât cei recunoscuți ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

**1.4.2.2. Martorii**

Pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă aberații structurale ale cromozomului *in vivo* la celule spermatogoniale, la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul.

Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese, astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinătorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită de cea prin care se administrează substanța de testat și doar o singură prelevare a probelor. În plus, se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

| Substanța                 | Nr. CAS   | Nr. EINECS |
|---------------------------|-----------|------------|
| ciclofosfamidă            | 50-18-0   | 200-015-4  |
| ciclofosfamidă monohidrat | 6055-19-2 |            |
| ciclohexilamină           | 108-91-8  | 203-629-0  |
| mitomicină C              | 50-07-7   | 200-008-6  |
| acrilamidă monomerică     | 79-06-1   | 201-173-7  |
| trietilenmelamină         | 51-18-3   | 200-083-5  |

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicule și manipulați în același fel ca și grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea inter-animale și frecvența celulelor cu aberații cromozomiale, provenite de la martori anteriori. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau publicate care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

**▼B****1.5. MOD DE LUCRU****1.5.1. Numărul de animale**

Fiecare grupă tratată și martor trebuie să includă minimum cinci animale de sex masculin, analizabile.

**1.5.2. Modalitatea de tratare**

Substanțele de testat se administrează de preferință o dată sau de două ori (și anume un singur tratament sau două tratamente). Substanțele de testat se mai pot administra în doze fracționate, și anume două tratamente în aceeași zi la distanță de doar câteva ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare de material. Alte modalități de administrare ar trebui să fie justificate în mod științific.

La grupa cu doză maximă prelevarea probelor după tratament se realizează în două momente. Deoarece substanța de testat poate să influențeze cinetica ciclului celular, prima și ultima prelevare de probe se realizează la intervale de 24 de ore și respectiv de 48 de ore după tratament. Pentru alte doze decât doza maximă, prelevarea probelor ar trebui să se realizeze la un interval de 24 de ore sau la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular după tratament, cu excepția cazului în care se cunoaște un alt moment corespunzător de prelevare pentru detectarea efectelor (6).

În plus, se pot utiliza și alte momente de prelevare. De exemplu, pentru produsele chimice care pot produce cromozomi întârziați sau pot să aibă efecte independente de faza S, o prelevare timpurie a probelor ar putea fi adecvată (1).

Adecvarea unui tratament repetat ar trebui să se determine de la caz la caz. După un program de tratamente repetate, animalele ar trebui să fie sacrificate după 24 de ore (1,5 ori durata ciclului celular) de la ultimul tratament. Se pot utiliza momente suplimentare de prelevare a probelor, dacă este necesar.

Înainte de sacrificare, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de substanță de inhibare a metafazei (de exemplu Colcemid® sau colchicină). Probele de la animale se prelevează apoi la un interval corespunzător. Pentru șoareci intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore; pentru hamsterii chinezești intervalul este de 4-5 ore.

**1.5.3. Dozele**

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale și același regim de tratare ca în studiul principal ce urmează (7). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la toxicitatea maximă până la toxicitatea minimă sau lipsă. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale.

**▼B**

Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (ca hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în celulele spermatogoniale (de exemplu o diminuare a proporției de mitoze spermatogoniale în raport cu prima și a doua metafază meiotică; reducerea respectivă nu ar trebui să fie mai mare de 50 %).

1.5.4. **Test-limită**

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corporală/zi, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul-limită.

1.5.5. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau a unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. **Prepararea cromozomilor**

Imediat după sacrificare, suspensiile celulare obținute de la unul sau două testicule se expun la o soluție hipotonică și se fixează. Celulele se întind apoi pe lamele și se colorează.

1.5.7. **Analiza**

Pentru fiecare animal ar trebui să se analizeze minimum 100 de celule în metafază, bine etalate (de exemplu minimum 500 de celule în metafază pentru fiecare grupă). Dacă se observă un număr mai mare de aberații, numărul specificat se poate reduce. Toate lamelele, inclusiv cele cu celule de la martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent înainte de examinarea la microscop. Deoarece metodele de preparare a lamelelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu  $2n \pm 2$ .

2. **DATE**

2.1. **PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de celule cu aberații cromozomiale de structură și numărul de aberații cromozomiale per celulă. Diferitele tipuri de aberații cromozomiale de structură ar trebui să fie consemnate împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupele tratate și pentru grupele martor. Lacunele se consemnează și se raportează separat, dar în general acestea nu se includ în frecvența totală a aberațiilor.

**▼B**

Dacă se observă concomitent mitoză și meioză, ar trebui să se determine raportul dintre mitozele spermatogoniale, în prima, respectiv în a doua metafază meiotică; această determinare ar trebui să se realizeze pentru toate animalele tratate și cele martori negativi, pe un eșantion total de 100 celule în diviziune pentru fiecare animal pentru a stabili un posibil efect citotoxic. Dacă se constată doar mitoză, ar trebui să se determine indexul mitotic în minimum 1 000 de celule pentru fiecare animal.

## 2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de doză a numărului relativ de celule cu aberații cromozomiale sau o creștere netă a numărului de celule cu aberații la o singură doză și la o singură prelevare a probelor. În primul rând ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (8). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor de testare.

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vivo* de aberație cromozomială pe celule spermatogoniale indică faptul că substanța de testat produce aberații cromozomiale de structură în celulele sexuale ale speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu produce aberații cromozomiale în celulele germinale ale speciei testate.

Ar trebui să se discute probabilitatea ca substanța de testat sau metabolismul acesteia să ajungă la țesutul țintă.

## 3. RAPORT

### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrănire etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

**▼B**

## Condițiile de testare:

- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- justificarea căii de administrare selectate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea momentelor de sacrificare;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;
- metodele de preparare a lamelelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

## Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- indexul mitotic;
- procentul de celule spermatogoniale în mitoză în raport cu cele din prima și a doua metafază meiotică;
- tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;
- numărul total de aberații pentru fiecare grupă;
- numărul de celule cu aberații pentru fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- modificările ploidiei, dacă există.

## Discutarea rezultatelor.

## Concluzii.

## ▼B

4.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.
6. Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.
7. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
8. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.



**▼B****B.24. TESTUL PETEI (*SPOT TEST*) LA ȘOARECI****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Acesta este un test *in vivo* pe șoareci, în care embrionii aflați în dezvoltare sunt expuși la substanțele chimice de testat. Celulele țintă sunt melanoblastele, iar genele de interes sunt cele care controlează pigmentarea blănii. Embrionii aflați în dezvoltare sunt heterozigoți pentru un număr dintre aceste gene care determină culoarea blănii. În cursul unor evenimente genetice, o mutație sau o pierdere a alelelor dominante ale acestor gene dintr-o melanoblastă determină exprimarea fenotipului recesiv la celulele descendenților, acest fapt manifestându-se prin apariția unei pete de culoare pe suprafața blănii la puii de șoareci. Se evaluează numărul descendenților cu aceste pete (mutații), iar frecvența acestora se compară cu aceea observată la descendenții proveniți din embrionii tratați doar cu solvent. Testul petei decelează apariția presupuselor mutații somatice ce survin în celulele fetale.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI***Pregătire*

Dacă este posibil, substanțele de testat se dizolvă sau se suspensionază în soluție izotonică salină. Substanțele chimice insolubile în apă sunt dizolvate sau suspensionate în vehicule corespunzătoare. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu substanța de testat și nu trebuie să producă efecte toxice. Se utilizează soluții proaspăt preparate.

**Animalele de experiență**

Se împerechează șoareci din linia T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c<sup>ch</sup>p/c<sup>ch</sup>p; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting; s/s) fie cu linia HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), fie cu linia C57BL (nonagouti, a/a). Se mai pot folosi alte împerecheri corespunzătoare, cum ar fi între NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) și DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) pentru a produce descendenți nonagouti.

**▼B****Număr și sex**

Se tratează un număr suficient de femele gestante pentru a produce un număr corespunzător de descendenți pentru fiecare doză de tratament. Mărimea corespunzătoare a eșantionului este dată de numărul petelor observate la șoarecii tratați în comparație cu datele obținute la lotul martor. Rezultatele negative se acceptă numai după ce s-au inventariat cel puțin 300 de descendenți de la femelele tratate cu doza maximă.

**Utilizarea martorilor negativi și pozitivi**

Este necesar să fie disponibile date martor simultane obținute de la șoarecii tratați numai cu vehicul (martor negativ). Pentru a mări sensibilitatea testului, pot fi puse laolaltă și date martor istorice de la același laborator, cu condiția să fie omogene. În cazul în care nu se detectează niciun efect mutagen al substanței de testat, pot fi folosite ca martor pozitiv rezultatele recente obținute în același laborator pe loturi tratate cu o substanță cunoscută ca fiind mutagenă.

**Calea de administrare**

Calea obișnuită de administrare a substanței la femelele gestante este intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Pot fi utilizate, după caz, și alte căi de administrare.

**Doze**

Se folosesc cel puțin două doze, inclusiv o doză care să determine apariția semnelor de toxicitate sau reducerea numărului de pui la o fătare. Pentru substanțele netoxice trebuie folosită doza maximă care poate fi administrată.

**Mod de operare**

În mod normal, se administrează un tratament unic, în ziua a opta, a noua sau a zecea de gestație, considerând ziua 1 ziua în care se observă pentru prima dată dopul vaginal. Aceste zile corespund zilelor 7,25, 8,25 și 9,25 de la concepție. Tratamente succesive se pot efectua în zilele menționate.

**Analiză**

În intervalul cuprins între trei și patru săptămâni de la fătare, descendenții se codează și se examinează pentru observarea eventualelor pete apărute. Se disting trei categorii de pete:

- (a) pete albe de până la 5 mm pe linia medio-ventrală, despre care se presupune că apar prin moarte celulară (WMVS);
- (b) pete galbene, de tip agouti, dispuse în regiunile mamare, genitale, axilare și inghinale, pe gât, precum și în mijlocul frunții, despre care se presupune că apar ca urmare a procesului de nediferențiere (MDS);
- (c) pete pigmentare și pete albe distribuite aleatoriu pe piele, despre care se presupune că provin din mutațiile somatice (RS).

**▼B**

Toate cele trei clase sunt descrise și înregistrate, dar numai ultima, RS, prezintă relevanță din punct de vedere genetic. Problemele pe care le ridică distincția între MDS și RS pot fi rezolvate prin examinarea probelor de blană prin microscopie cu fluorescență.

Se înregistrează anomaliile morfologice genetice macroscopice apărute la descendenți.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate ca număr total al descendenților inventariați și numărul celor care au una sau mai multe pete produse prin mutații somatice. Datele din loturile tratate și loturile martor negativ se compară printr-o metodă corespunzătoare. De asemenea, datele sunt prezentate în raport cu seria de pui de la o fătare.

3. **RAPORT**

3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- liniile folosite la încrucișare;
- numărul femelelor gestante din loturile tratate și loturile martor;
- mărimea medie a seriei de pui din loturile tratate și loturile martor, la naștere și la înțărare;
- dozele de substanță de testat;
- solventul utilizat;
- ziua gestației în care s-a efectuat tratamentul;
- calea de administrare;
- numărul total de descendenți examinați și numărul celor care prezintă WMVS, MDS și RS din loturile tratate și loturile martor;
- anomalii morfologice macroscopice;
- relația doză-răspuns la RS dacă este posibil;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

3.2. **EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.25. TRANSLOCAȚII EREDITARE LA ȘOARECI****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚIE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Testul translocației ereditare la șoareci decelează modificările cromozomiale structurale și numerice ale celulelor germinale de mamifere, apărute la descendenții din prima generație. Tipurile de modificări cromozomiale detectate sunt translocații reciproce și, dacă în experiment sunt incluși și descendenții femele din generația  $F_1$ , pierderea cromozomului X. Purtătorii de translocații și femelele XO prezintă fertilitate redusă care este folosită la selecția descendenților  $F_1$  pentru efectuarea analizelor citogenetice. Sterilitatea completă este determinată de anumite tipuri de translocații (X-autozom și tipul c-t). Translocațiile se observă citogenetic în timpul celulele meiotice în diachineză-metafaza I la masculi, fie că sunt masculi  $F_1$ , fie descendenți masculi ai femelelor  $F_1$ . Femelele XO sunt identificate citogenetic prin prezența a doar 39 de cromozomi în mitozele măduvei osoase.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA TESTULUI***Pregătire*

Substanțele chimice de testat se dizolvă în soluție izotonică salină. Dacă sunt insolubile în apă, se dizolvă sau se suspensionează într-un vehicul corespunzător. Se utilizează soluții proaspăt preparate ale compusului de testat. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu compusul de testat și nu trebuie să producă efecte toxice.

*Calea de administrare*

Calea de administrare obișnuită este intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare.

*Animale de experiență*

Pentru a facilita reproducerea și verificarea citologică, aceste experimente se fac pe șoareci. Nu este necesară utilizarea anumitor linii de șoareci. Cu toate acestea, mărimea medie a seriei de pui din linia respectivă trebuie să fie în medie mai mare de opt și să fie relativ constant.

Se folosesc animale mature din punct de vedere sexual.

**▼B****Numărul animalelor**

Numărul de animale necesare depinde de frecvența apariției translocațiilor spontane și de rata minimă de inducție necesară pentru un rezultat pozitiv.

De obicei, testul se efectuează pe descendenții masculi  $F_1$ . Trebuie testați cel puțin 500 de descendenți masculi  $F_1$  pe lot. Dacă experimentul include și descendenți femele  $F_1$ , sunt necesari 300 de masculi și 300 de femele.

**Utilizarea martorilor negativi și pozitivi**

Este necesar să fie disponibile date martor adecvate obținute din martori simultani și din martori istorici. Atunci când sunt disponibile rezultate acceptabile de la martorul pozitiv din alte experimente desfășurate recent în același laborator, acestea pot fi folosite în locul unui martor pozitiv simultan.

**Doze**

Se testează o singură doză, de obicei doză maximă asociată cu producerea de efecte toxice minime, dar care nu produce efecte asupra comportamentului de reproducere sau asupra supraviețuirii. Pentru stabilirea unei relații doză/răspuns sunt necesare încă două doze mai mici. În cazul expunerii la substanțe chimice netoxice, este necesar să se administreze doză maximă posibilă.

**Mod de operare****Tratament și împerechere**

Există două scheme de tratament. Administrarea în doză unică este cel mai des utilizată; se poate recurge și la administrarea substanței de testat șapte zile pe săptămână timp de 35 de zile. Numărul de împerecheri după efectuarea tratamentului depinde de schema de tratament și trebuie să asigure prelevarea de celule germinale tratate în toate stadiile. La sfârșitul perioadei de împerechere, femelele sunt plasate în cuști individuale. Când gestantele fată, se înregistrează data, mărimea seriei de pui și sexul descendenților. Toți puii masculi sunt înțărcați, iar femelele pui sunt eliminate, cu excepția cazului în care sunt incluse și ele în experiment.

**Testarea heterozigoților de translocație**

Se utilizează una din cele două metode posibile:

- testarea, prin analize citogenetice, a fertilității descendenței  $F_1$  și verificarea ulterioară a eventualilor purtători de translocații prin analiză citogenetică;
- analiza citogenetică a tuturor descendenților masculi  $F_1$  fără o selecție prealabilă prin testarea fertilității.

**(a) Testarea fertilității**

Fertilitatea redusă a unui descendent  $F_1$  poate fi stabilită prin observații asupra mărimii seriei de pui și/sau prin analizarea conținutului uterin la femelele gestante.

Este necesar să se stabilească criteriile de determinare a fertilității normale sau reduse la linia de șoareci folosită.

## ▼B

Observații asupra mărimii seriei de pui: Masculii  $F_1$  care urmează să fie testați sunt plasați în cuști individuale cu femele din același experiment sau din colonie. Cuștile se verifică zilnic începând cu a optsprezecea zi de la împerechere. La fătare se înregistrează mărimea seriei de pui și sexul descendenței  $F_2$ , după care puii sunt eliminați. Dacă se testează descendența feminină  $F_1$ , descendenții  $F_2$  proveniți din serii mici de pui sunt păstrați pentru testări suplimentare. Toate femelele purtătoare de translocatii sunt verificate prin analiza citogenetică a unei translocatii la oricare din descendenții lor masculi. Femelele XO se recunosc prin schimbarea raportului între sexe masculi/femele la descendenții lor, de la 1:1 la 1:2. Într-o metodă secvențială, animalele  $F_1$  normale nu fac obiectul unei alte verificări dacă prima serie de pui  $F_2$  atinge sau depășește o valoare normală predeterminată, în caz contrar observându-se o a doua sau o a treia serie de pui  $F_2$ .

Animalele  $F_1$  care nu pot fi clasificate ca normale după observațiile efectuate pe cel mult trei serii de pui  $F_2$ , sunt testate prin analiza conținutului uterin al femelelor gestante sau sunt supuse direct analizei citogenetice.

Analiza conținutului uterin: Reducerea mărimii seriei de pui în cazul purtătorilor de translocatii se datorează morții embrionilor, astfel încât un număr mare de implanturi moarte reprezintă un indiciu al prezenței unei translocatii la animalul testat. Fiecare mascul  $F_1$  care urmează să fie testat este împerecheat cu două-trei femele. Momentul concepției se stabilește prin examinarea zilnică, dimineața, în vederea decelării prezenței dopului vaginal. Femelele se sacrifică în a 14-16-a zi de gestație, înregistrându-se apoi implanturile vii sau moarte din uterul fiecăreia.

(b) Analiză citogenetică

Preparatele testiculare se obțin prin tehnica uscării la aer. Purtătorii de translocatii se identifică prin prezența configurațiilor multivalente la diachineză-metafaza I la nivelul spermatocitelor primari. Prezența a cel puțin două celule cu asociații multivalente constituie dovada necesară că animalul testat este purtătorul unei translocatii.

Dacă nu s-a produs nicio selecție prin analiza reproducerii, toți masculii  $F_1$  se examinează citogenetic. Se analizează microscopic cel puțin 25 de celule în faza de diachineză-metafaza I pentru fiecare mascul. Examinarea metafazei mitotice în spermatogonii sau în măduva osoasă este necesară la masculii  $F_1$  cu testicule mici și rupere meiotică înainte de diachineză sau la femele  $F_1$  suspecte de a fi XO. Prezența unui cromozom neobișnuit de lung și/sau scurt în fiecare a zecea celulă indică o translocatie specială care induce sterilitatea masculului (tip c-t). Anumite translocatii X-autozome care determină sterilitatea masculină pot fi identificate numai printr-o serie de analize ale benzilor de cromozomi mitotici. Prezența a 39 de cromozomi în toate cele 10 mitoze indică starea XO la o femelă.

## 2.

## DATE

Datele sunt prezentate sub formă de tabele.

Mărimea medie a seriei de pui și raportul numeric între sexe se înregistrează de la naștere până la înțarcare pentru fiecare perioadă de împerechere.

**▼B**

Pentru evaluarea fertilității animalelor  $F_1$ , se prezintă mărimea medie a seriei de pui pentru toate împerecherile normale și mărimea fiecărei serii de pui proveniți din animale  $F_1$  purtătoare de translocații. Pentru examinarea conținutului uterin se specifică numărul mediu al implanturilor vii și moarte în împerecherile normale și numărul implanturilor vii și moarte pentru fiecare împerechere a purtătorilor de translocații  $F_1$ .

Pentru analiza citogenetică a diachineză-metafazei I, se înregistrează numărul tipurilor de configurații multivalente și numărul total de celule pentru fiecare purtător de translocații.

Pentru fiecare exemplar  $F_1$  steril se raportează numărul total de împerecheri și durata perioadei de împerechere. Se fac analize citogenetice detaliate și se cântăresc testiculele.

Pentru femelele XO se specifică mărimea medie a seriei de pui, raportul numeric dintre sexe la descendența  $F_2$  și rezultatele analizei citogenetice.

În cazul în care posibili purtători de translocații  $F_1$  sunt preselecționați în teste de fertilitate, tabelele trebuie să cuprindă informații despre numărul celor care sunt confirmați cu heterozigoți de translocație.

Se raportează, de asemenea, date referitoare la experimentele pe martorii pozitivi și negativi.

### 3. **RAPORT**

#### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- linia de șoareci, vârsta animalelor, greutatea animalelor tratate;
- numărul animalelor parentale de fiecare sex din lotul tratat și din lotul martor;
- condițiile de testare, descrierea amănunțită a tratamentului, dozele, solvenții, schema de împerechere;
- numărul și sexul descendenților pentru fiecare femelă, numărul și sexul descendenților aleși pentru analiza de translocație;
- momentul și criteriile analizei de translocație;
- numărul și descrierea amănunțită a purtătorilor de translocații, inclusiv date privind reproducerea și conținutul uterin, după caz;
- metode citogenetice și detalii asupra analizei microscopice, preferabil cu imagini;
- evaluarea statistică;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**▼B**

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.



**▼B****B.26. TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE****1. METODĂ**

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 408 (1998) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate ce pot fi antrenate de expunerea repetată pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțarcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare, și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la risc la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Această metodă de testare pune un accent suplimentar pe efectele neurologice și furnizează indicii despre efectele imunologice și de reproducere. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină numărul maxim posibil de informații. Studiul ar trebui să aibă în vedere identificarea substanțelor care au potențialul de a produce efecte neurotoxice sau imunologice ori efecte asupra organelor de reproducere, ceea ce ar justifica efectuarea în continuare a unor studii mai aprofundate.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Doza:** este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate raportată la unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu mg/kg) ori ca o concentrație constantă în alimentație (ppm).

**Dozajul:** este un termen general care cuprinde doza, frecvența acestuia și durata administrării.

**DFEAO:** este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

**1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt, de asemenea, sacrificate și autopsiate.

**▼B****1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.4.1. Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale sănătoase, care au fost acomodate la condițiile de laborator timp de minimum 5 zile și nu au mai fost folosite în alte experiențe. Trebuie precizate specia, sușa, proveniența, sexul, greutatea și vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. Cuștile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

**1.4.2. Pregătirea dozelor**

Substanța testată se administrează prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau prin alimente ori apa de băut. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico-chimice ale substanței testate.

Acolo unde este necesar, substanța testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluții/suspensii apoase, urmată de o soluție/emulsie în ulei (de exemplu ulei de porumb) și în cele din urmă de o soluție în alți purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor alții decât apa. Se determină stabilitatea substanței testate în condițiile de administrare.

**1.4.3. Condițiile de testare****1.4.3.1. Animalele de laborator**

Specia preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Este recomandabil să se folosească animale adulte tinere, sănătoase, provenind din sușe de laborator obișnuite. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie însărcinate. Administrarea începe cât mai curând posibil după înțarcare și în niciun caz mai târziu de vârsta de nouă săptămâni. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite trebuie să fie minime și să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex. Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

**1.4.3.2. Numărul și sexul animalelor**

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate pentru sacrificare înainte de sfârșitul studiului. Pe baza cunoștințelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de 10 animale (5 de fiecare sex) în grupul martor și în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistența oricărui efect toxic. Durata perioadei post-tratament se fixează în funcție de efectele observate.

**▼B**1.4.3.3. *Doze*

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri și există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori-limită (a se vedea punctul 1.4.3.4). Nivelul dozelor este stabilit în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare și iau în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța testată sau substanțe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăților fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanței, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu și moartea sau suferința severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns și nivelul dozei, precum și nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedește că la formarea seriei descrescătoare a dozelor este optimă progresia geometrică cu rația 2-4 și deseori adăugarea unui al patrulea grup de probă este preferabil folosirii unor rații foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtător, dacă se folosește un purtător la administrarea substanței testate. Cu excepția substanței testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile de probă. Dacă se folosește un purtător, grupul martor primește purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanța testată se administrează în alimente și provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea se datorează modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice și efectele asupra consumului de hrană sau apă ori asupra stării de nutriție a animalelor.

1.4.3.4. *Testul-limită*

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodologia descrisă pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile și toxicitatea nu este de așteptat în baza datelor existente pentru substanțele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori-limită este aplicabil cu excepția cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

## 1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța testată zilnic, șapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanța testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, cu excepția soluțiilor apoase, când se pot folosi 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obișnuit efecte exacerbate la concentrații mai mari, este recomandabil ca variațiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentrația astfel încât să se asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

## ▼B

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente, se folosește fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul folosirii sondei, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

1.5.2. **Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observație ulterioară trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute în afara cuștii, de preferință într-o încălț standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele se consemnează cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele urmărite cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu: lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și reacție la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu automutilarea, mersul înapoi) (1).

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor dar cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor, toate animalele trebuie examinate.

Spre sfârșitul perioadei de expunere și în orice caz nu înainte de săptămâna 11, se evaluează reactivitatea senzorială la diferite tipuri de stimuli (1) (de exemplu stimuli auditivi, vizuali, proprioceptivi) (2) (3) (4), se evaluează forța de apucare (5) și activitatea motorie (6). Detalii suplimentare referitoare la metodele utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Se pot folosi și metode diferite de cele menționate.

Observațiile funcționale pot fi omise spre sfârșitul studiului atunci când sunt disponibile date despre observațiile funcționale din alte studii și observațiile clinice zilnice nu au evidențiat deficite funcționale.

## ▼B

În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupurile care, pe de altă parte, prezintă simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar interfera semnificativ cu desfășurarea testului funcțional.

#### 1.5.2.1. *Greutatea corporală și consumul de hrană/apă*

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanță testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

#### 1.5.2.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La sfârșitul perioadei de testare, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

La sfârșitul perioadei de testare și atunci când se colectează probe de sânge pe parcurs, se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, număratoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, număratoarea plachetelor sangvine, măsurarea timpului de coagulare.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la fiecare animal imediat înainte de sacrificare sau ca parte a acestei proceduri (dar nu de la cele găsite muribunde sau care au fost sacrificate pe parcurs). Ca și la investigațiile hematologice, se pot recolta pe parcurs probe pentru analize de biochimie chimică. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană în timpul nopții dinainte de recoltare<sup>(1)</sup>. Analizele de plasmă sau ser cuprind sodiu, potasiu, glucoză, colesterol total, uree, acid uric în sânge, creatinină, proteine și albumine totale și mai mult de două enzime indicând efectele hepatocelulare (ca alaninaminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gamaglutamiltranspeptidaza și sorbitol dehidrogenaza). Pot fi incluse și măsurători ale altor enzime (hepatice sau de altă origine) și ale acizilor biliari, care pot furniza informații utile în anumite situații.

Optional, pot fi efectuate următoarele analize de urină în ultima săptămână a studiului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Dacă proprietățile cunoscute ale substanței testate pot sau se apreciază că pot să afecteze curbele metabolice conexe, trebuie efectuate și alte analize, cum sunt: calciu, fosfor, trigliceride à jeun, hormoni specifici, methemoglobină și colinesterază. Acestea trebuie identificate pentru substanțele chimice din anumite clase sau de la caz la caz.

<sup>(1)</sup> Pentru mai multe analize de ser și plasmă, în special pentru glucoză, este de preferat absența hranei în timpul nopții. Cel mai important motiv este că variația crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efectele mai subtile și ar face dificilă interpretarea. Pe de altă parte însă, lipsa hranei pe durata nopții poate să interfereze cu metabolismul general al animalelor și riscă, în special în studiile în care substanța testată este administrată în alimente, să perturbe expunerea zilnică la această substanță. Dacă se optează pentru lipsa hranei pe timpul nopții, trebuie efectuate analize de biochimie clinică după observațiile funcționale ale studiului.

## ▼B

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

Dacă datele istorice de referință sunt insuficiente, este cazul să se ia în considerare necesitatea de a determina variabilele hematologice și de biochimie clinică înainte de începerea administrării; în general, nu se recomandă ca aceste date să se obțină înaintea tratamentului (7).

1.5.2.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, uterul, ovarele, timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

Țesuturile următoare se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii (conservați prin exces de fixativ și apoi imersie) aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, vezica biliară (șoarece), ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și o puncție aspirativă de măduvă osoasă examinată pe loc), piele și ochi (dacă s-au constatat modificări la examenele oftalmologice). Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

1.5.2.5. *Se examinează toate leziunile macroscopice*

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

**▼B****2. DATE ȘI RAPORT****2.1. DATE**

Datele se prezintă individual. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, inclusiv momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

**2.2. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare cuprinde următoarele informații:

**2.2.1. Substanța testată:**

- natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;
- datele de identificare chimică;
- purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.

**2.2.2. Animalele de laborator:**

- specia și sușa folosite;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- greutatea individuală a animalelor la începutul testului.

**2.2.3. Condițiile de testare:**

- motivația alegerii dozelor;
- detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- detalii privind administrarea substanței testate;
- dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrația în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei.

**2.2.4. Rezultatele:**

- greutatea corporală și modificările în greutatea corporală;
- consumul de hrană și apă, dacă este cazul;
- rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;

**▼B**

- natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu);
- rezultatele examenului oftalmologic;
- activitatea senzorială, forța de apucare, aprecierea activității motorii (dacă sunt disponibile);
- valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare;
- valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;
- greutatea corporală la moartea animalului, greutatea organelor interne, raporturile dintre greutatea organului intern și greutatea corporală;
- constatările de la autopsie;
- o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
- date privind absorbția, dacă sunt disponibile;
- prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

### 3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.
2. Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999-1003.
3. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691-704.
4. Moser, V. C., Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267-283.
5. Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C., Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, pp. 233-236.
6. Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C., Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599-609.
7. Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies”, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198-201.



**▼B****B.27. TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA NEROZĂTOARE****1. METODĂ**

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 409 (1998) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată la risc pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțarcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Metoda are în vedere identificarea la speciile nerozătoare a efectelor adverse ale expunerii chimice și se folosește doar:

- în cazul în care efectele observate în alte studii indică necesitatea unei clarificări/caracterizări cu ajutorul unei a doua specii, nerozătoare; sau
- în cazul în care studiile toxico-cinetice indică faptul că folosirea unei anumite specii nerozătoare reprezintă cea mai relevantă alegere a animalului de laborator; sau
- în cazul în care alte anumite motive justifică folosirea unei specii nerozătoare.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Doză:** este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate pe unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu mg/kg) sau în concentrații constante în alimentație (ppm).

**Dozaj:** este un termen general care cuprinde doza, frecvența acesteia și durata administrării.

**DFEAO:** este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: *No Observable Adverse Effect Level*) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

**1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt, de asemenea, sacrificate și autopsiate.

**▼B****1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.4.1. Alegerea speciei de animale**

Specia nerozătoare folosită în mod obișnuit este câinele, care trebuie să fie de rasă definită; frecvent este folosit bassetul. Pot fi folosite și alte specii, de exemplu porcul sau porcul pitic. Nu se recomandă primatele, iar folosirea lor trebuie justificată. Trebuie folosite animale tinere și sănătoase, iar în cazul câinelui administrarea trebuie să înceapă de preferință la vârsta de 4-6 luni și nu mai târziu de vârsta de nouă luni. Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeași specie/rasă.

**1.4.2. Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale tinere și sănătoase, care au fost acomodate la condițiile de laborator și care nu au mai fost folosite în alte experiențe. Durata aclimatizării depinde de specia aleasă și de proveniența sa. Se recomandă cel puțin cinci zile pentru câini sau pentru porci hrăniți anume în acest scop în colonia laboratorului și cel puțin două săptămâni pentru aceleași animale din surse externe. Trebuie precizate specia, sușa, proveniența, sexul, greutatea și vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. Cuștile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

**1.4.3. Pregătirea dozelor**

Substanța testată se administrează în alimente sau în apa de băut ori prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau în capsule. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico-chimice ale substanței testate.

Acolo unde este necesar, substanța testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluții/suspensii apoase, urmată de o soluție/emulsie în ulei (de exemplu ulei de porumb) și în cele din urmă de o soluție în alți purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor, alții decât apa. Trebuie determinată stabilitatea substanței testate în condițiile de administrare.

**1.5. MOD DE LUCRU****1.5.1. Numărul și sexul animalelor**

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puțin opt animale (patru femele și patru masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de sfârșitul testului. Numărul animalelor la încheierea studiului trebuie să fie adecvat pentru ca evaluarea efectelor toxice să aibă semnificație. Pe baza cunoștințelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de opt animale (patru de fiecare sex) în grupul martor și în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistența oricărui efect toxic. Durata perioadei post-tratament se fixează în funcție de efectele observate.

**▼B****1.5.2. Dozajul**

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri și există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori-limită (a se vedea 1.5.3). Nivelul dozelor se stabilește în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare și ia în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța testată sau substanțe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăților fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanței, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu și moartea sau suferința severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns și nivelul dozei precum și nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedește că, la formarea seriei descrescătoare a dozelor, este optimă progresia geometrică cu rația 2-4 și deseori adăugarea unui al patrulea grup de testare este preferabil folosirii unor rații foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtătorul, dacă se folosește un purtător la administrarea substanței testate. Cu excepția substanței testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se folosește un purtător, grupul martor primește purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanța testată se administrează în alimente și provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea de datează de modificări caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării de nutriție a animalelor.

**1.5.3. Testul la valori-limită**

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodele de testare descrise pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile și dacă toxicitatea nu este de așteptat în baza datelor existente pentru substanțele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori-limită este aplicabil cu excepția cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

**1.5.4. Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța testată zilnic, șapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanța testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. În mod normal, volumul trebuie menținut cât mai scăzut posibil. Cu excepția substanțelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obișnuit efecte exacerbate la concentrații mai mari, este recomandabil ca variațiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentrația astfel încât să asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

**▼B**

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente se poate folosi fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul administrării prin sondă sau în capsulă, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

**1.5.5. Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observații ulterioare trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute, dacă e posibil, în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele de toxicitate trebuie să fie consemnate cu atenție, incluzând ora apariției, gradul și durata acestora. Observațiile cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu: lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare.

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor și cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor legate de tratament, toate animalele trebuie examinate.

**1.5.5.1. Greutatea corporală și consumul de hrană/apă**

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanța testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

▼ B1.5.5.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La încheierea testului, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

Se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, număratoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, număratoarea plachetelor sangvine și o măsurare a potențialului de coagulare, cum sunt timpul de coagulare, timpul de protrombină sau de tromboplastină, la începutul studiului și apoi la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și, în cele din urmă, la încheierea testului.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la toate animalele la începutul studiului, la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și la încheierea testului. Domeniile de analiză care trebuie luate în considerare sunt balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților și funcțiile hepatică și renală. Alegerea analizelor specifice este influențată de observațiile asupra modului de acțiune a substanței testate. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană pentru o perioadă adecvată speciei înainte de prelevarea probei de sânge. Analizele recomandabile cuprind măsurarea următoarelor: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoză à jeun, alaninaminotransferază, aspartat aminotransferază, ornitin decarboxilază, gamaglutamiltranspeptidază, acid uric, albumină, creatinină sangvină, bilirubină totală și proteine serice totale.

Analizele de urină trebuie efectuate cel puțin la început, apoi la jumătatea perioadei și la încheierea testului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar. Analizele cuprind: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie. Se pot folosi și alți parametri dacă este necesar să se extindă investigarea efectului (efectelor) observat(e).

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Alte analize care se pot dovedi necesare pentru o evaluare toxicologică adecvată includ: analiza lipidelor, a hormonilor, echilibrul acido-bazic, methemoglobina și inhibarea colinesterazei. Pot fi folosite analize de biochimie clinică suplimentare, dacă este necesar să se extindă investigarea efectelor observate. Acestea trebuie identificate pentru substanțele din anumite clase sau de la caz la caz.

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

1.5.5.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, ovarele, uterul, glanda tiroidă (cu glandele paratiroidale) timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

**▼B**

Țesuturile următoare trebuie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, ochii, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, vezica biliară, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii, aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și o puncție aspirativă de măduvă osoasă examinată pe loc), piele. Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

#### 1.5.5.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor conservate ale tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

Se examinează toate leziunile macroscopice.

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

## 2. **DATE ȘI RAPORT**

### 2.1. **DATE**

Datele se prezintă individual. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

### 2.2. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare cuprinde următoarele informații:

**▼B**

- 2.2.1. **Substanța testată:**
- natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;
  - datele de identificare chimică;
  - purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.
- 2.2.2. **Animalele de laborator:**
- specia și sușa folosite;
  - numărul, vârsta și sexul animalelor;
  - sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
  - greutatea individuală a animalelor la începutul testului.
- 2.2.3. **Condițiile de testare:**
- motivația alegerii dozelor;
  - detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
  - detalii privind administrarea substanței testate;
  - dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul;
  - detalii privind calitatea hranei și a apei.
- 2.2.4. **Rezultatele:**
- greutatea corporală și modificările în greutatea corporală;
  - consumul de hrană și apă, dacă este cazul;
  - rezultate privind reacția toxică, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;
  - natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu);
  - rezultatele examenului oftalmologic;
  - valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare;
  - valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;
  - greutatea corporală la moartea animalului, greutatea organelor interne, raporturile greutatea organului intern/greutate corporală;
  - constatările de la autopsie;
  - o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
  - date referitoare la absorbție, dacă e cazul;
  - prelucrarea statistică a rezultatelor, unde este cazul.
- Discutarea rezultatelor.
- Concluzii.

**▼B****B.28. STUDIUL DE TOXICITATE SUBCRONICĂ – ADMINISTRARE CUTANATĂ EXPERIMENT EFECTUAT ÎN 90 DE ZILE ASUPRA UNOR ROZĂTOARE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Nu sunt specificate.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Se aplică zilnic substanța de testat pe cale cutanată, în concentrații crescătoare, mai multor loturi de testare, fiind administrată o doză pe lot timp de 90 de zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, se observă zilnic animalele pentru a pune în evidență simptomele de toxicitate. Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului sunt supuse autopsiei.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului în cel puțin cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Cu puțin timp înainte de test, se tunde blana din regiunea dorsală a animalelor. Se poate recurge la radere, dar în acest caz operația se efectuează cu aproximativ 24 de ore înainte de test. În timpul tunderii sau al raderii, trebuie evitată orice lezare a pielii. Suprafața care se degajează în vederea aplicării substanței nu trebuie să fie mai mică de 10 % din suprafața corporală. Pentru a decide zona care trebuie degajată și dimensiunile suprafeței care trebuie tratată, se ia în calcul greutatea animalului. Dacă testul vizează substanțele solide care, după caz, se pot pulveriza, substanța de testat trebuie umezită cu ajutorul apei sau, la nevoie, al unui vehicul adecvat, astfel încât să se poată obține un bun contact cu pielea. Substanțele de testat lichide se folosesc în general în stare nediluată. Se efectuează o aplicare zilnică timp de cinci până la șapte zile pe săptămână.

**1.6.2. Condiții de testare****1.6.2.1. Animale de experiență**

Animalele de laborator utilizate sunt șobolanul, iepurele sau cobaiul adult. Pot fi folosite și alte specii, dar folosirea lor trebuie justificată. La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de  $\pm 20\%$  valoarea medie. Când studiul de toxicitate subcronică prin administrare cutanată este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.



**▼B****1.6.2.2. Număr și sex**

Se folosesc, pentru fiecare doză, cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) a căror piele este sănătoasă. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 20 de animale (10 din fiecare sex) la doza cea mai mare timp de 90 de zile, care poate fi supus observației cu privire la reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 28 zile care urmează tratamentului.

**1.6.2.3. Doze**

Se folosesc cel puțin trei doze, precum și un lot martor sau, după caz, un lot martor pentru vehicul. Perioada de expunere este de cel puțin 6 ore pe zi. Se aplică substanța de testat în fiecare zi în același moment, iar dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Dacă se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea dozei, acesta este administrat lotului martor în aceleași condiții ca și pentru loturile tratate, iar doza administrată corespunde cu cea primită de lotul tratat cu doza maximă. Doza maximă trebuie să producă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace sau trebuie să provoace rar moartea. Doza minimă nu trebuie să provoace niciun efect toxic. Dacă există informații privind expunerea umană, doza minimă trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund dozelor mici și intermediare, precum și în loturile martor, incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

Dacă aplicarea substanței de testat provoacă o iritație cutanată gravă, se reduc concentrațiile; aceasta poate avea ca efect diminuarea, chiar dispariția, celorlalte efecte toxice la doza mare. În plus, dacă leziunile cutanate sunt foarte grave, poate fi necesară oprirea experimentului și inițierea unui studiu nou, la concentrații mai mici.

**1.6.3. Test-limită**

Dacă în urma unei experiențe preliminare realizate cu o doză de 1 000 miligrame pe kilogram sau o doză mai mare în funcție de expunerea umană posibilă, când se cunoaște această valoare, nu apare niciun efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă.

**1.6.4. Perioada de observație**

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

**▼B**

## 1.6.5. Mod de operare

Se pun animalele în cuști individuale. În condiții ideale, substanța de testat se administrează animalelor șapte zile pe săptămână timp de 90 de zile.

Animalele din toate loturile satelit destinate observației ulterioare sunt menținute în viață timp de încă 28 zile, fără tratament, în vederea constatării vindecării sau a persistenței efectelor toxice. Durata de expunere este de minimum șase ore pe zi.

Substanța de testat se aplică pe o suprafață aproximativ egală cu 10 % din suprafața totală a corpului. În cazul substanțelor foarte toxice, suprafața tratată poate fi mai mică, dar stratul trebuie să fie cât mai subțire și mai uniform posibil.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament de tifon și al unui plastru neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină pansamentul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acestora de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă.

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observația zilnică vizează, între altele, modificări ale părului și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal greutatea animalelor. Se recomandă, de asemenea, măsurarea săptămânală a consumului de hrană. Animalele sunt observate cu regularitate pentru a evita, pe cât posibil, pierderea lor din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul experimentului, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor nesatelit tratate. Animalele muribunde se scot imediat și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează de regulă asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

- (a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza mare și celor din lotul martor; dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;
- (b) examen hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la sfârșitul perioadei de testare;

**▼B**

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la sfârșitul perioadei de testare; testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală; alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică<sup>(1)</sup>, transaminaza serică glutamo-oxaloacetică<sup>(2)</sup>, ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale. Pentru o evaluare toxicologică adecvată pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, metemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate;

(d) nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Dacă datele istorice de bază sunt insuficiente, înainte de începerea tratamentului trebuie să se determine parametrii hematologici și biochimici clinici.

#### Autopsia

Toate animalele supuse testului fac obiectul autopsiei generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, creier, inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară, tiroida/paratiroidele, țesut timic, traheea și plămânii, inimă, aortă, (glandele salivare), ficat, splină, rinichi, glande suprarenale, pancreas, gonade, uter (glande genitale anexe), (piele), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, vezică urinară, ganglioni limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervi periferici, stern cu măduvă osoasă, (ochi), (femur – incluzând articulația), (măduva spinării la trei niveluri – cervical, torace mediu și lombar) și (glande lacrimale extraorbitale). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

#### Examenul histopatologic

(a) Se efectuează examen histopatologic complet pentru toate organele și țesuturile recoltate de la animalele din lotul martor și loturile expuse la doza maximă.

(b) Se examinează toate leziunile macroscopice.

<sup>(1)</sup> În prezent cunoscută sub denumirea de alaninaminotransferază.

<sup>(2)</sup> În prezent cunoscută sub denumirea de aspartataminotransferază.

**▼B**

- (c) Se examinează organele-țintă ale animalelor din loturile expuse la celelalte doze.
- (d) Se examinează histopatologic plămânii animalelor din lotul expus la doza minimă și la cea intermediară pentru a detecta infecțiile, deoarece acestea oferă o evaluare acceptabilă a stării de sănătate a animalelor. Trebuie să fie luată în considerare, de asemenea, examinarea histopatologică a ficatului și rinichiului în cazul acestor loturi. La animalele din aceste loturi nu se fac în mod curent examene histopatologice suplimentare, dar acestea trebuie făcute întotdeauna în cazul acelor organe pentru care s-au constatat leziuni la lotul expus la doza maximă.
- (e) Atunci când este folosit un lot satelit, trebuie să se efectueze examene histopatologice pe țesuturile și organele pentru care s-au constatat leziuni la celelalte loturi tratate.

## 2. **DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

## 3. **RAPORT**

### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;
- condițiile de testare;
- dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;
- răspunsul toxic pe sexe și doză;
- dacă este posibil, nivelul care nu are niciun efect;
- momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;
- efectele toxice sau de alt tip;
- momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;
- consumul de hrană și greutatea corporală;
- observațiile oftalmologice;
- examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;
- testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);
- rezultatele autopsiei;

**▼B**

- descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
- tratarea statistică a rezultatelor, după caz;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

▼ **M4****B.29. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 90 DE ZILE****REZUMAT**

Această metodă de testare revizuită B.29 a fost concepută pentru caracterizarea completă a toxicității substanței chimice testate prin calea de inhalare în urma expunerii repetate pe o perioadă limitată (90 de zile), precum și pentru a furniza date pentru evaluările cantitative ale riscului prin inhalare. Grupuri de minim 10 masculi și 10 femele de rozătoare sunt expuse câte 6 ore pe zi timp de 90 de zile (13 săptămâni) la: (a) substanța chimică testată la trei sau mai multe niveluri de concentrație; (b) aer filtrat (grup martor negativ); și/sau (c) vehicul (grup martor pentru vehicul). În general, animalele sunt expuse 5 zile pe săptămână, dar este permisă și expunerea timp de 7 zile pe săptămână. Masculii și femelele se testează întotdeauna, dar pot fi supuși unor niveluri de concentrație diferite dacă se cunoaște că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată. Această metodă permite conducătorului studiului flexibilitatea de a include grupuri satelit (de reversibilitate), lavajul bronhoalveolar (BAL), teste neurologice și evaluări suplimentare clinice chimice testate.

**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 413 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 413 originale privind testarea subcronică a fost adoptată în 1981 (1). Această metodă de testare B.29 [ca echivalent al variantei revizuite a Orientării 413 (2009)] a fost actualizată pentru a reflecta nivelul științific și pentru a satisface cerințele de reglementare curente și viitoare.
2. Studiile de toxicitate subcronică prin inhalare se folosesc, în principal, pentru determinarea concentrațiilor de reglementare pentru evaluarea riscului pentru lucrători în cadru ocupațional. De asemenea, ele sunt utilizate pentru evaluarea riscurilor umane în domeniul rezidențial, de transport și de mediu. Această metodă permite caracterizarea efectelor adverse în urma expunerii zilnice repetate, prin inhalarea substanței chimice testate timp de 90 de zile (aproximativ 10 % din durata de viață a unui șobolan). Datele obținute din studii de toxicitate subcronică prin inhalare se pot folosi pentru evaluări cantitative ale riscului și pentru alegerea concentrațiilor pentru studii cronice. Această metodă nu este destinată în mod specific testării nanomaterialelor. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul 39 (2).

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

3. Toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată trebuie luate în considerare de laboratorul de testare înainte de efectuarea studiului, pentru îmbunătățirea calității studiului și minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate concentrații de testare corespunzătoare includ: identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; și date rezultate din testarea toxicității acute prin inhalare. În cazul în care în cursul studiului se anticipează sau se observă neurotoxicitatea, conducătorul studiului poate alege să includă și evaluări adecvate, de exemplu un set de observații funcționale (FOB) și măsurarea activității motorii. Deși momentele expunerii în funcție de examinările specifice pot fi critice, desfășurarea acestor activități suplimentare nu trebuie să afecteze protocolul studiului de bază.

**▼M4**

4. Diluțiile substanțelor corozive sau iritante testate pot fi testate la concentrații care generează gradul dorit de toxicitate. Vă rugăm să consultați Ghidul 39 (2) pentru informații suplimentare. La expunerea animalelor la aceste materiale, concentrațiile vizate trebuie să fie suficient de mici pentru a nu induce durere sau suferință accentuată, dar totuși suficiente pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt selectate de la caz la caz, preferabil pe baza unui studiu de stabilire a intervalului, conceput corespunzător, care furnizează informații privind efectul critic, pragul de iritare și momentul apariției manifestărilor (a se vedea punctele 11-13). Trebuie să se prezinte justificarea pentru selectarea concentrației.
5. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită trebuie să fie eutanasiate. Animalele muribunde sunt considerate în același mod ca și animalele care mor în cursul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau expuse unor suferințe intense și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unui ghid OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3).

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

6. Se utilizează rozătoare adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul. Dacă se utilizează alte specii, decizia trebuie să fie motivată.

**Pregătirea animalelor**

7. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua randomizării, animalele trebuie să fie adulți tineri, în vârstă de 7 până la 9 săptămâni. Greutățile corporale trebuie să fie în intervalul de  $\pm 20\%$  față de greutatea medie pentru fiecare sex. Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cel puțin 5 zile înainte de începerea testului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

**Îngrijirea animalelor**

8. Animalele sunt identificate individual, preferabil cu transpondere subcutanate, pentru a facilita observarea și a evita confuziile. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele folosite în scopuri experimentale trebuie să fie de  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă este menținută, în mod ideal, în intervalul 30-70 %, deși, acest lucru ar putea să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri animalele sunt închise în cuști, în grupuri, în funcție de sex și concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele sunt expuse doar în zona nasului, poate fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau prin imobilizare. Fixarea poate afecta puncte finale fiziologice, cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator pe minut. În cazul în care sunt disponibile date generice pentru a arăta că nu se produc asemenea modificări în vreo măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea prealabilă la tuburile de imobilizare. Animalele expuse unor aerosoli cu întregul corp sunt plasate individual în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare clasice și certificate utilizate în laboratoare, cu excepția perioadei de expunere iar apa potabilă de la rețeaua municipală se poate furniza în mod nelimitat. Iluminatul trebuie să fie artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

▼ **M4****Incintele de inhalare**

9. La selectarea unei incinte de inhalare se iau în considerare natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). În general, expunerea doar în zona nasului este preferată pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere prin intermediul întregului corp, dar acest lucru trebuie să fie justificat în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, volumul total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor particulare sunt descrise în Ghidul 39 (2).

**STUDII DE TOXICITATE****Concentrațiile-limită**

10. Spre deosebire de studiile de toxicitate acută, în studiile de toxicitate subcronică prin inhalare nu sunt definite limite de concentrație. Concentrația testată maximă trebuie să țină seama de: 1. concentrația maximă realizabilă; 2. nivelul de expunere umană în „cele mai nefavorabile condiții”; 3. necesitatea de a menține un aport adecvat de oxigen; și/sau 4. considerații care țin de bunăstarea animalelor. În absența unor limite bazate pe date, se pot utiliza limitele acute din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (13) (până la o concentrație maximă de 5 mg/l pentru aerosoli, 20 mg/l pentru vapori și 20 000 ppm pentru gaze); a se vedea Ghidul 39 (2). În cazul în care este necesar să se depășească aceste limite la testarea gazelor sau substanțelor chimice testate foarte volatile (de exemplu, agenți frigorifici), trebuie să se prezinte justificarea. Concentrația-limită trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce un stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

**Studiul de stabilire a intervalului**

11. Înainte de a începe studiul principal, poate fi necesar un studiu de stabilire a intervalului. Un studiu de stabilire a intervalului este mai cuprinzător decât un studiu de observare, deoarece nu se limitează la alegerea concentrației. Cunoștințele dobândite în urma unui studiu de stabilire a intervalului pot conduce la un studiu principal reușit. Un studiu de stabilire a intervalului poate, de exemplu, să furnizeze informații tehnice privind metodele analitice, granulometrie, descoperirea mecanismelor toxice, date de patologie clinică și histopatologice și estimări asupra posibilelor concentrații NOAEL și MTD în studiul principal. Conducătorul studiului poate alege să folosească studiul de stabilire a intervalului pentru identificarea pragului de iritare a căilor respiratorii (de exemplu, prin examenul histopatologic al căilor respiratorii, testarea funcției pulmonare sau lavaj bronhoalveolar), a concentrației superioare care este tolerată de animale fără a provoca un stres excesiv și a parametrilor care vor caracteriza cel mai bine toxicitatea unei substanțe chimice testate.
12. Într-un studiu de stabilire a intervalului se pot stabili unul sau mai multe niveluri de concentrație. În funcție de efectele alese, se expun trei până la șase masculi și trei până la șase femele la fiecare nivel de concentrație. Un studiu de stabilire a intervalului durează cel puțin 5 zile și, în general, nu mai mult de 28 de zile. Raportul de studiu trebuie să conțină justificarea alegerii concentrațiilor pentru studiul principal. Obiectivul studiului principal este să demonstreze relația concentrație-răspuns pe baza efectului anticipat ca fiind cel mai sensibil. Concentrația inferioară este, în mod ideal, o concentrație fără efect advers observabil iar concentrația superioară trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).



▼ **M4**

13. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de stabilire a intervalului, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv relațiile structură-activitate și date pentru substanțe similare (a se vedea punctul 3). Un studiu de stabilire a intervalului poate confirma/infirma efectele considerate a fi cele mai sensibile din punct de vedere al mecanismului, de exemplu inhibarea colinesterazei de către fosfați organici, formarea methemoglobinei de către agenți toxici pentru eritrocite, hormonii tiroidieni ( $T_3$ ,  $T_4$ ) pentru agenții toxici față de tiroidă, proteinele, valoarea LDH sau neutrofilele în lavajul bronhoalveolar pentru particule puțin solubile nedăunătoare sau aerosoli iritanți pentru plămâni.

**Studiul principal**

14. În studiul principal de toxicitate subacută se folosesc, în general, trei niveluri de concentrație și grupuri martor negative (cu aer) și/sau cu vehicul studiate în paralel, după cum este necesar (a se vedea punctul 18). Toate datele disponibile sunt utilizate pentru a contribui la selectarea nivelurilor de expunere adecvate, inclusiv rezultatele studiilor de toxicitate sistemică, metabolism și cinetică (trebuie acordată o atenție specială evitării nivelurilor ridicate de concentrație care saturează procesele cinetice). Fiecare grup testat conține cel puțin 10 rozătoare masculi și 10 rozătoare femele expuse la substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 5 zile pe săptămână, pe o perioadă de 13 săptămâni (durata totală a studiului trebuie să fie de cel puțin 90 de zile). Animalele pot fi expuse și 7 zile pe săptămână (de exemplu, la testarea produselor farmaceutice inhalate). În cazul în care se știe că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată, sexele pot fi expuse la niveluri diferite de concentrație pentru optimizarea răspunsului la concentrație, așa cum se arată la punctul 15. Atunci când alte specii de rozătoare sunt expuse doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. La utilizarea unei durate de expunere sub 6 ore/zi sau în cazul în care este necesar să se efectueze un studiu cu expunerea întregului corp pe o durată lungă (de exemplu, 22 de ore/zi), trebuie să se prezinte o justificare [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Alimentarea se sistează în perioada expunerii, în afară de cazul în care expunerea depășește 6 ore. La expunerea la nivelul întregului corp se poate asigura apa.

15. Concentrațiile-țintă selectate trebuie să identifice organele-țintă și să demonstreze o relație clară concentrație-răspuns:

- nivelul de concentrație ridicat trebuie să inducă efecte toxice, dar să nu determine simptome persistente sau mortalitate, fapt ce ar preveni o evaluare semnificativă;
- nivelurile de concentrație intermediare trebuie să fie administrate eșalonat, astfel încât efectele toxice să fie graduale între concentrația redusă și cea ridicată;
- nivelul de concentrație redusă trebuie să producă o toxicitate redusă sau să nu producă semne de toxicitate.

**Sacrificările pe parcursul studiului**

16. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total. Trebuie să se prezinte justificarea pentru recurgerea la sacrificări pe parcursul studiului, iar analizele statistice le vor lua în considerare în mod corespunzător.

**▼ M4****Studiul satelit (de reversibilitate)**

17. Un studiu satelit (de reversibilitate) se poate folosi pentru a observa reversibilitatea, persistența sau apariția cu întârziere a toxicității pentru o perioadă post-tratament de lungime adecvată, dar nu mai mare de 14 zile. Grupurile satelit (de reversibilitate) constau în 10 masculi și 10 femele expuse în paralel cu animalele folosite în scopuri experimentale din studiul principal. Grupurile din studiile satelit (de reversibilitate) sunt expuse la substanța chimică testată la nivelul maxim de concentrație și trebuie să existe grupuri martor cu aer și/sau vehicul studiate în paralel, după caz (a se vedea punctul 18).

**Animalele din grupul martor**

18. Animalele din grupul martor negativ (cu aer) studiat în paralel se manipulează într-o manieră identică cu cele din grupul de testare, cu excepția faptului că sunt expuse la aer filtrat în locul substanței chimice testate. În cazul în care se folosește apa sau altă substanță pentru generarea atmosferei de testare, trebuie să se includă în studiu un grup martor pentru vehicul, în locul grupului martor negativ (cu aer). Când este posibil, se folosește apa ca vehicul. Când se folosește apa ca vehicul, animalele din grupul martor sunt expuse la aer cu aceeași umiditate relativă ca și grupurile expuse. Alegerea unui vehicul adecvat se bazează pe un studiu preliminar corespunzător sau pe date anterioare. În cazul în care nu se cunoaște bine toxicitatea unui vehicul, conducătorul studiului poate alege să folosească atât un grup martor negativ (aer) cât și un martor pentru vehicul, dar această abordare este categoric descurajată. În cazul în care datele anterioare arată că vehiculul nu este toxic, nu este necesar un grup martor negativ (aer) și se folosește doar un grup martor pentru vehicul. În cazul în care un studiu preliminar al unei substanțe chimice testate formulate într-un vehicul nu prezintă nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată și se va utiliza acest control pentru vehicul.

**CONDIȚII DE EXPUNERE****Administrarea concentrațiilor**

19. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația aleasă și/sau forma fizică cu cea mai mare probabilitate de prezență în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele chimice testate higroscopice și reactive din punct de vedere chimic trebuie să fie testate în condiții de aer uscat. Trebuie avut grijă să se evite generarea unor concentrații explozive. Materialele sub formă de particule pot fi supuse unor procese mecanice pentru reducerea dimensiunii particulelor. Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).

**Distribuția granulometrică**

20. Granulometria trebuie să fie efectuată pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametru aerodinamic median masiv al particulelor (DAMM) de la 1 la 3  $\mu\text{m}$ , cu o abatere standard geometrică ( $\sigma_g$ ) în intervalul 1,5-3,0 (4). Trebuie depus un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, dar în cazul în care acest lucru nu se poate realiza trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele de vapori metalici vor fi mai mici decât acest standard, iar particulele cu sarcină electrică și fibrele pot fi mai mari.

**▼ M4****Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul**

21. În mod ideal, substanța chimică se testează fără vehicul. În cazul în care este necesar să se folosească un vehicul pentru a genera o concentrație și o dimensiune a particulelor corespunzătoare pentru substanța chimică testată, se preferă apa. Întotdeauna când o substanță chimică testată este dizolvată într-un vehicul, trebuie să se demonstreze stabilitatea sa.

**MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE****Debitul de aer în incintă**

22. Debitul de aer prin incinta de expunere este controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea în timp real a concentrației (sau stabilității în timp a) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de control al parametrilor dinamici relevanți pentru inhalare. În cazul în care concentrația este monitorizată în timp real, frecvența măsurătorii debitelor de aer se poate reduce la o singură măsurătoare pentru fiecare expunere și fiecare zi. Trebuie acordată o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte pentru expunere doar în zona nasului. Concentrația de oxigen trebuie să fie de minimum 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se poate atinge acest standard, trebuie măsurate concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon. În cazul în care măsurătorile în prima zi de expunere arată că aceste gaze sunt la niveluri corespunzătoare, nu mai sunt necesare alte măsurători.

**Temperatura și umiditatea relativă în incintă**

23. Temperatura incintei trebuie să se mențină la  $22 \pm 3$  °C. Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor, pentru expunerea în zona nasului și a întregului corp, trebuie să fie monitorizată și înregistrată orar în timpul fiecărei expuneri, dacă este posibil. Este preferabil ca umiditatea relativă să fie menținută în intervalul 30-70 % dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

**Substanța chimică testată: concentrația nominală**

24. Când este posibil, trebuie să se calculeze și să se înregistreze concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală este masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este folosită pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

**Substanța chimică testată: concentrația efectivă**

25. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prin prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie susținută printr-un studiu preliminar privind caracterizările specifice ale substanței chimice testate. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponent se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în

## ▼ M4

acest caz sunt necesare date analitice care să demonstreze similaritatea între compoziția materialului antrenat de aer și cea a materialului inițial. În cazul în care nu sunt disponibile aceste informații, poate fi necesară reanalizarea la intervale regulate a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer). Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă.

26. Trebuie să se folosească un lot de substanță chimică testată pe întreaga durată a studiului, dacă este posibil, iar proba testată să fie păstrată în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței chimice testate, inclusiv puritatea sa și, dacă este realizabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără limitare la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară determinată prin analize de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei de testare nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu, culoare, natura fizică etc.).
27. Atmosfera de expunere este menținută cât mai constantă posibil. Pentru a demonstra stabilitatea condițiilor de expunere se poate utiliza un dispozitiv de monitorizare în timp real, de exemplu un fotometru pentru aerosoli sau un analizor de carbon total pentru vapori. Concentrația efectivă în incintă se măsoară de minimum 3 ori în timpul fiecărei zile de expunere pentru fiecare nivel de expunere. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. În mod ideal, această probă se prelevează apoi pe întreaga perioadă de expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu trebuie să se abată de la concentrația medie cu mai mult de  $\pm 10\%$  pentru gaze și vapori sau  $\pm 20\%$  pentru aerosolii cu lichide sau solide. Se calculează și se înregistrează timpul necesar pentru echilibrarea incintei ( $t_{95}$ ). Durata unei expuneri acoperă timpul în care este generată substanța chimică testată. Aceasta ia în considerare timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incintă ( $t_{95}$ ) și pentru descompunere. Îndrumări pentru estimarea  $t_{95}$  pot fi găsite în Ghidul 39 (2).
28. Pentru amestecurile foarte complexe constând în gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), fiecare fază se poate comporta diferit într-o incintă de inhalare. Prin urmare, se selectează cel puțin o substanță indicatoare (analit), de obicei substanța activă principală din amestec, din fiecare fază (gaz/vapori și aerosol). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, trebuie să se raporteze concentrația analitică pentru amestecul total și nu doar pentru ingredientul activ sau substanța indicatoare (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

#### Substanța chimică testată: distribuția granulometrică

29. Granulometria aerosolilor trebuie să fie efectuată cel puțin săptămânal pentru fiecare nivel de concentrație, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de granulometrie (APS). În cazul în care se obține o echivalență a rezultatelor obținute cu impactorul în cascadă și un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu.

▼ **M4**

30. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/ barbotor de gaze trebuie să se folosească în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometriei trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența tuturor concentrațiilor în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, se iau măsuri pentru a minimiza datele neconcludente care pot duce la necesitatea de repetare a unui studiu.
31. Granulometria se efectuează pentru vapori atunci există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule între atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte.

**OBSERVAȚII**

32. Observarea clinică a animalelor trebuie să se facă înainte, în timpul și ulterior perioadei de expunere. Poate fi indicată observarea mai frecventă în funcție de răspunsul animalelor în timpul expunerii. În cazul în care observarea animalelor este împiedicată de utilizarea tuburilor de imobilizare, incintelor slab iluminate pentru expunerea întregului corp sau atmosferelor opace, animalele se observă cu atenție după expunere. Prin observarea înainte de expunerea din ziua următoare se poate evalua reversibilitatea sau exacerbarea efectelor toxice.
33. Toate observațiile se consemnează în evidențele individuale pentru fiecare animal. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.
34. Observațiile privind animalele în cușcă trebuie să includă modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor; modificarea sistemului respirator și sistemului circulator; modificările sistemului nervos; modificări în activitatea somato-motorie și modelele de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremorului, convulsiilor, salivării, diareei, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi privind bradipneea reflexă sau hipo/hipertermia asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate. În protocolul studiului pot fi incluse evaluări suplimentare, de exemplu privind cinetica, biomonitorizarea, funcționarea plămânilor, retenția unor materiale slab solubile care se acumulează în țesutul pulmonar și modificările de comportament.

**GREUTATEA CORPORALĂ**

35. Greutatea animalelor individuale se consemnează cu puțin înaintea primei expuneri (ziua 0), apoi de două ori pe săptămână (de exemplu: vineri și luni, pentru a evidenția recuperarea după un weekend fără expunere sau la un interval de timp pentru a permite evaluarea toxicității sistemice) și la momentul morții sau eutanasierii. În cazul în care nu există efecte în primele 4 săptămâni, greutatea corporală pot fi măsurate săptămânal pe restul duratei studiului. În cazul în care se folosesc animale din grupuri satelit (cu reversibilitate), acestea se cântăresc în continuare săptămânal pe întreaga perioadă de recuperare. La încheierea studiului, toate animalele sunt cântărite cu puțin înainte de sacrificare, pentru a permite calcularea corectă a rapoartelor între greutatea organelor și cea corporală.

**CONSUMUL DE HRANĂ ȘI APĂ**

36. Consumul de hrană trebuie să fie măsurat săptămânal. De asemenea, se poate măsura și consumul de apă.

▼ **M4****PATOLOGIA CLINICĂ**

37. Evaluările de patologie clinică trebuie să fie efectuate pentru toate animalele, inclusiv pentru animalele din grupul martor și grupul satelit (de reversibilitate), atunci când sunt sacrificate. Se consemnează intervalul de timp între încetarea expunerii și recoltarea de sânge, în special dacă restabilirea efectului vizat este rapidă. Se recomandă prelevarea după expunere pentru acei parametri cu timp scurt de înjumătățire plasmatică (de exemplu, COHb, CHE și MetHb).
38. Tabelul 1 prezintă parametri de patologie clinică necesari, în general, pentru toate studiile toxicologice. Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când se consideră util, pe baza toxicității presupuse sau observate. Conducătorul studiului poate opta pentru evaluarea unor parametri suplimentari pentru o mai bună caracterizare a toxicității substanței chimice testate (de exemplu, colinesterază, lipide, hormoni, echilibrul acido-bazic, methemoglobina sau corpii Heinz, creatinkinaza, raportul mieloid/eritroid, troponinele, gazele din sângele arterial, dehidrogenaza lactică, sorbitol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza și gama glutamil transpeptidaza).

*Tabelul 1***Parametri standard de patologie clinică**

| Examen hematologic                                |  |
|---|--|
| Număr de eritrocite                               | Număr total de leucocite                   |
| Hematocrit  | Formulă leucocitară                        |
| Concentrația de hemoglobină                       | Număr de plachete                          |
| Hemoglobina corpusculară medie                    | Potențial de coagulare (selecția<br>unul): |
| Volumul corpuscular mediu                         | — timp de protrombină                      |
| Concentrația hemoglobinei corpus-<br>culare medii | — timp de coagulare;                       |
| Reticulocite                                      | — timp de tromboplastină parțial           |
| Chimie clinică                                    |  |
| Glucoză (*)                                       | Alanin aminotransferază                    |
| Colesterol total                                  | Aspartat aminotransferază                  |
| Trigliceride                                      | Fosfatază alcalină                         |
| Azot ureic în sânge                               | Potasiu                                    |
| Bilirubină totală                                 | Sodiu                                      |
| Creatinină  | Calciu                                     |
| Proteine totale                                   | Fosfor                                     |
| Albumină  | Clor                                       |
| Globulină   |  |
| Analiza urinei (opțional)                         |  |
| Aspect (culoare și turbiditate)                   | Proteine totale                            |
| Volum   | Glucoză                                    |
| Greutate specifică sau osmolalitate               | Hematurie                                  |
| pH  |  |

(\*) Deoarece o perioadă îndelungată de privare de hrană poate introduce dezechilibre în măsurătorile de glucoză la animalele tratate comparativ cu animalele din grupul martor, conducătorul studiului determină dacă este cazul ca animalele să fie private de hrană. În cazul în care se aplică o perioadă de privare de hrană, aceasta va fi corespunzătoare speciei folosite; pentru șobolani, aceasta poate fi de 16 ore (privare de hrană pe timpul nopții). Determinarea glucozei à jeun se poate face după privarea de hrană pe timpul nopții în ultima săptămână de expunere sau după privarea de hrană pe timpul nopții înainte de autopsie (în cazul din urmă, împreună cu toți ceilalți parametri de patologie clinică).

▼ **M4**

39. În cazul în care există dovezi că principalul loc de depunere și retenție este în căile respiratorii inferioare (adică alveolele), lavajul bronhoalveolar (BAL) poate fi tehnica de elecție pentru analiza cantitativă a parametrilor doză-efect ipotetici, cu accentul pe alveolită, inflamație pulmonară și fosfolipidoză. Aceasta permite studierea adecvată a modificărilor doză-răspuns și a evoluțiilor în timp ale leziunilor alveolare. Lichidul BAL poate fi analizat pentru determinarea nivelului total de leucocite și a formulei leucocitare, a proteinelor totale și a lactat dehidrogenazei. Alți parametri care pot fi luați în considerare sunt cei indicatori ai leziunilor lizozomale, fosfolipidozei, fibrozei și inflamației iritante sau alergice, putând include determinarea citokinelor/chemokinelor pro-inflamatoare. În general, măsurătorile BAL completează rezultatele examinărilor histopatologice, dar nu le pot înlocui. Îndrumări pentru modul de efectuare a lavajului pulmonar pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

## EXAMENUL OFTALMOLOGIC

40. Cu ajutorul unui oftalmoscop sau unui dispozitiv echivalent, la toate animalele trebuie să se efectueze examinări oftalmologice ale fundului de ochi, mediului de refracție, irisului și conjunctivei, înainte de administrarea substanței chimice testate și pentru toate grupurile cu concentrație ridicată și grupurile martor la final. În cazul în care se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele din celelalte grupuri, inclusiv din grupul satelit (de reversibilitate).

## PATOLOGIA MACROSCOPICĂ ȘI GREUTATEA ORGANELOR

41. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animală, sunt supuse unei evacuări complete a sângelui (dacă este posibil) și unei autopsii. Se consemnează timpul între încheierea ultimei expuneri a fiecărui animal și sacrificarea sa. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce a fost descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se efectuează imediat ce este posibil, în mod normal după una sau două zile. Toate modificările patologice macroscopice trebuie să fie consemnate pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.
42. Tabelul 2 prezintă organele și țesuturile care se păstrează într-un mediu corespunzător în timpul autopsiei în vederea unor examene histopatologice. Conservarea organelor și țesuturilor încadrare în paranteze pătrate [ ] și a altor organe și țesuturi este la aprecierea conducătorului studiului. Organele trecute cu caractere **aldine** se curăță și cântăresc în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Tiroida și epididimul se cântăresc doar dacă este necesar, deoarece artefactele în urma curățării pot împiedica evaluarea histopatologică. Țesuturile și organele sunt fixate în formol tamponat 10 % sau alt fixator adecvat, imediat după autopsie și nu mai puțin de 24-48 de ore înainte de curățare, în funcție de fixatorul folosit.

▼ **M4**

Tabelul 2

**Organe și țesuturi conservate în cursul autopsiei macroscopice**

|  |   |
|--|---|
| <b>Glande suprarenale</b>  | Esofag  |
| Aortă  | [Bulb olfactiv]   |
| Măduva osoasă (și/sau aspirat proaspăt)  | <b>Ovare</b>  |
| <b>Creier</b> (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și punte)  | Pancreas  |
| Cec  | Glande paratiroide  |
| Colon  | Nerv periferic (sciatic sau tibial, preferabil aproape de mușchi)                                       |
| Duoden   | Hipofiză  |
| <b>[Epididim]</b>  | Prostată  |
| [Ochi (retină, nerv optic) și pleoape]   | Rect  |
| Femur și articulația genunchiului  | Glande salivare   |
| Vezica biliară (în cazul în care este prezentă)  | Vezicule seminale   |
| [glande Harder]  | Piele   |
| <b>Inimă</b>   | Măduva spinării (cervicală, toracică mediană și lombară)  |
| Ileon  | <b>Splină</b>   |
| Jejun  | Stern   |
| <b>Rinichi</b>   | Stomac  |
| [glande lacrimale (extraorbitale)]   | Dinți   |
| Laringe (3 niveluri, inclusiv baza epiglotei)  | <b>Testicule</b>  |
| <b>Ficat</b>   | <b>Timus</b>  |
| <b>Plămân</b> (toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale)  | <b>Tiroida</b>  |
| Noduli limfatici din zona hilusului pulmonar, în special în cazul substanțelor chimice testate cu particule slab solubile. Pentru examinări și studii mai aprofundate de natură imunologică, pot fi luați în considerare noduli limfatici suplimentari, de exemplu cei din regiunile mediastinale, cervicale/submandibulare și/sau auriculare. | [Limbă]   |
| Noduli limfatici (distal față de punctul de intrare)   | Trahee (cel puțin 2 niveluri, inclusiv o secțiune longitudinală prin carină și o secțiune transversală) |
| Glande mamare (la femele)  | [Ureter]  |
| Mușchi (coapsă)  | [Uretră]  |
| Țesuturi nazo-faringiene [minim 4 niveluri; un nivel include ductul nazo-faringian și țesutul limfoid asociat mucoasei nazale (NALT)]  | Vezica urinară  |
|  | <b>Uter</b>   |
|  | Organe-țintă  |
|  | Toate leziunile și formațiunile mari  |



▼ **M4**

43. Plămânii se prelevează intacti, se cântăresc și se tratează cu un fixator adecvat la o presiune de 20-30 cm coloană de apă, pentru a asigura conservarea structurii pulmonare (5). Secțiunile sunt colectate pentru toți lobi la un nivel, inclusiv bronhiile principale, dar în cazul în care se efectuează lavajul pulmonar, lobul nelavat trebuie să fie secționat în trei niveluri (nu secțiuni seriale).
44. Se examinează minimum 4 niveluri de țesuturi nazo-faringiene, dintre care unul include ductul nazo-faringian (5) (6) (7) (8) (9), pentru a permite examinarea adecvată a epitelului scuamos, tranzițional (respirator neciliat), respirator (respirator ciliat) și olfactiv și a țesutului limfatic de drenare (NALT) (10) (11). Se examinează trei niveluri ale laringelui, iar unul dintre aceste niveluri trebuie să includă baza epiglotei (12). Se examinează minimum trei niveluri ale traheii, inclusiv o secțiune longitudinală prin carina de la bifurcația bronhiilor extrapulmonare și o secțiune transversală.

**EXAMENUL HISTOPATOLOGIC**

45. Se efectuează o evaluare histopatologică a tuturor organelor și țesuturilor enumerate în Tabelul 2 pentru grupurile martor și de concentrație ridicată și pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificate în cursul studiului. Se acordă o atenție specială organelor căilor respiratorii, organelor-țintă și leziunilor macroscopice. Organele și țesuturile care prezintă leziuni în grupul de concentrație ridicată se examinează la toate grupurile. Conducătorul studiului poate alege să efectueze evaluările histopatologice pentru grupuri suplimentare, pentru a demonstra o relație clară concentrație-răspuns. Atunci când se folosește un grup satelit (de reversibilitate), se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate. În cazul în care intervin excesiv de multe decese premature sau alte probleme în grupul cu expunere ridicată, compromițând semnificația datelor, se examinează histopatologic următorul nivel inferior de concentrație. Se încearcă o corelare a observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

**DATE ȘI RAPORT****Date**

46. Trebuie să se furnizeze date individuale despre animale referitoare la greutatea corporală, consumul de hrană, patologia clinică, patologia macroscopică, greutatea organelor și examenul histopatologic. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, prezentând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate din motive umane, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei. Toate rezultatele cantitative și incidentale se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Se poate folosi orice metodă statistică acceptată, iar metodele statistice și datele care urmează să fie analizate se aleg în etapa în care este conceput studiul.

**Raportul de testare**

47. Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

*Animalele testate și îngrijirea lor:*

- descrierea condițiilor de ținere în cuști, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de iluminat și identificarea regimului alimentar;

**▼ M4**

- specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea altor animale decât șobolanul. Se prezintă sursa și datele anterioare, în cazul în care provin de la animale expuse la condiții similare de expunere, adăpost și privare de hrană;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- metoda de randomizare;
- descrierea oricăror condiții dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli.

*Substanța chimică testată:*

- natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);
- date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut.

*Vehiculul:*

- justificarea utilizării vehiculului și alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);
- date istorice sau concomitente, care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului.

*Incinta de inhalare:*

- descrierea incintei de inhalare, inclusiv volumul și o diagramă;
- sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și pentru generarea atmosferei;
- echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, dimensiunii particulelor și concentrației efective;
- sursa de aer și sistemul folosit pentru condiționare;
- metodele folosite pentru calibrarea echipamentului, pentru a asigura o atmosferă de testare omogenă;
- diferența de presiune (pozitivă și negativă);
- orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);
- stabilitatea atmosferei de testare;
- amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;
- tratarea aerului introdus/extras;
- debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (expunerea întregului corp);
- timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare ( $t_{95}$ );
- numărul de schimburi de volum pe oră;
- dispozitive de măsurare (după caz).

*Datele privind expunerea:*

- justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;

**▼ M4**

- concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);
- concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), fiecare poate fi analizată separat;
- toate concentrațiile în aer se consemnează în unități de masă (mg/l, mg/m<sup>3</sup> etc.), nu în unități de volum (ppm, ppb etc.);
- distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică ( $\sigma_g$ ), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Se consemnează analizele granulometrice individuale.

*Condițiile de testare:*

- detaliile preparării substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor materialelor solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate;
- o descriere (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;
- detalii privind echipamentul utilizat pentru monitorizarea temperaturii incintei, umidității și debitului de aer prin incintă (adică realizarea unei curbe de calibrare);
- detalii privind echipamentul utilizat pentru prelevarea probelor în vederea determinării concentrației în incintă și a dimensiunii particulelor;
- detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);
- metoda de randomizare în evaluarea animalelor din grupurile de testare și martor;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);
- justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare.

*Rezultate:*

- prezentarea în formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;
- prezentarea în formă tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;
- prezentarea în formă tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și  $\sigma_g$ ;
- prezentarea în formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

▼ **M4**

- prezentarea în formă tabelară a greutatea animalelor individuale;
- prezentarea în formă tabelară a consumului de hrană;
- prezentarea în formă tabelară a datelor de patologie clinică;
- concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

*Discutarea și interpretarea rezultatelor:*

- trebuie acordată o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;
- trebuie să se abordeze inhalabilitatea particulelor din perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot realiza criteriile privind dimensiunea particulelor;
- în evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să fie incluse coerența metodelor folosite pentru a determina concentrațiile nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;
- trebuie să se analizeze cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);
- trebuie să se prezinte o explicație în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezintă semne de suferință gravă și prelungită, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3);
- trebuie să se identifice organul sau organele-țintă;
- trebuie să se determine NOAEL și LOAEL.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) OECD (1981), *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan E. și Redden J.C. (1994), *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), *Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology* (Chapter 9) în *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds.), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981), *Histopathological examination of the rat nasal cavity*. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990), *Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants*. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

**▼M4**

- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. În: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds.) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hamelers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

**▼ M4***Apendicele 1*

## DEFINIȚIE

**Substanță chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼ **M4****B.30. STUDII DE TOXICITATE CRONICĂ****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 452 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 452 a fost adoptată în 1981. S-a considerat necesară elaborarea acestei metode de testare revizuite B.30 pentru a reflecta evoluțiile recente în domeniul bunăstării animalelor și cerințelor de reglementare (1) (2) (3) (4). Actualizarea acestei metode de testare B.30 s-a realizat în paralel cu revizuirea capitolului B.32 din prezenta anexă („Studii privind carcinogenitatea”) și a capitolului B.33 din prezenta anexă („Studii combinate de toxicitate cronică și carcinogenitate”), cu obiectivul de a obține informații suplimentare de la animalele folosite în studiu și de a furniza detalii suplimentare privind alegerea dozelor. Această metodă de testare este concepută pentru a fi utilizată la testarea unei game largi de substanțe, inclusiv pesticide și produse chimice industriale.
  
2. Majoritatea studiilor de toxicitate cronică sunt efectuate pe specii de rozătoare, prin urmare, această metodă de testare este destinată aplicării în primul rând la studiile efectuate pe aceste specii. În cazul în care sunt necesare studii pe alte specii în afara rozătoarelor, se pot aplica, de asemenea, principiile și procedurile prezentate în această metodă de testare, împreună cu cele prezentate în capitolul B.27 din prezenta anexă [„Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (5)], cu modificările corespunzătoare, așa cum se arată în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (6).
  
3. Cele trei căi de administrare principale folosite în studiile de toxicitate cronică sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate și de calea de expunere probabilă în cazul omului. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).
  
4. Această metodă de testare se axează pe expunerea prin intermediul căii orale, calea cea mai folosită în cadrul studiilor de toxicitate cronică. În timp ce studiile de toxicitate cronică pe termen lung implicând căi de expunere cutanată sau prin inhalare ar putea fi necesare și pentru evaluarea riscului pentru sănătatea umană și/sau în cadrul anumitor regimuri de reglementare, aceste două căi de expunere implică o complexitate tehnică semnificativă. Asemenea studii vor trebui concepute de la caz la caz, deși metoda de testare prezentată aici pentru evaluarea toxicității cronice prin administrare orală ar putea forma baza unui protocol pentru studii de expunere prin inhalare și/sau cutanată, în ceea ce privește recomandările pentru perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc. Sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (6) (7) și pe cale cutanată (6). Capitolul B.8 din prezenta anexă (8) și capitolul B.29 din prezenta anexă (9), împreună cu Ghidul OCDE privind testarea toxicității acute prin inhalare (7) trebuie să fie consultate în mod special la conceperea unor studii mai lungi ce implică expunerea prin inhalare. Capitolul B.9 din prezenta anexă (10) trebuie consultat în cazul efectuării testului prin intermediul căii cutanate.

## ▼ M4

5. Studiul de toxicitate cronică furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată în timpul unei părți considerabile a perioadei de viață a speciei utilizate. Studiul va furniza informații privind efectele toxice ale substanței chimice testate; va indica organele-țintă și posibilitatea de acumulare. De asemenea, studiul poate furniza o estimare a nivelului la care nu se observă efecte adverse, ce poate fi folosită la stabilirea criteriilor pentru expunerea umană. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații posibil.
6. Obiectivele studiilor acoperite de această metodă de testare includ:
  - identificarea toxicității cronice a unei substanțe chimice testate;
  - identificarea organelor-țintă;
  - caracterizarea relației doză-răspuns;
  - identificarea nivelului la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL) sau a punctului de pornire pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);
  - estimarea efectelor de toxicitate cronică la niveluri de expunere umană;
  - furnizarea datelor pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (6).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. În evaluarea caracteristicilor toxicologice ale unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, înainte de efectuarea testului, pentru un protocol mai eficient al testului privind potențialul de toxicitate cronică și pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la concepția studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; orice informații privind modul de acțiune; rezultatele tuturor testelor de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; date toxicocinetice disponibile (cinetica pentru doză unică și doză repetată, acolo unde sunt disponibile), precum și date rezultate din studii de expunere repetată. Determinarea toxicității cronice se efectuează doar după ce s-au obținut informațiile inițiale privind toxicitatea din testele de toxicitate la doză repetată pe o perioadă de 28 de zile și/sau 90 de zile. Trebuie să se ia în considerare o abordare de testare a toxicității cronice în etape, ca parte a evaluării generale a potențialelor efecte adverse asupra sănătății a unei anumite substanțe chimice testate (11) (12) (13) (14).
8. Metodele statistice cele mai adecvate pentru analiza rezultatelor, ținând cont de protocolul experimentului și de obiective, se stabilesc înainte de începerea studiului. Aspectele care trebuie luate în considerare sunt, de exemplu, necesitatea ca statisticile să includă ajustarea pentru supraviețuire și analiza în cazul încheierii anticipate pentru unul sau mai multe grupuri. În Ghidul nr. 116 (6) și în Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (15) sunt prezentate orientări privind analizele statistice corespunzătoare și referințe de bază privind metodele statistice acceptate la nivel internațional.



## ▼M4

9. La efectuarea unui studiu de toxicitate cronică trebuie să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile din Ghidul OCDE nr. 19 privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (16), în special punctul 62 al documentului. Acest punct stipulează că *„În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, conducând la deteriorarea în continuare a stării, trebuie să se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia trebuie să includă considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, trebuie să crească frecvența observărilor, după cum este necesar. De asemenea, fără a afecta negativ scopul testului, se poate întrerupe temporar dozarea sau se poate reduce doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința.”*
10. În Ghidul nr. 116 (6), precum și în două publicații ale International Life Sciences Institute (17) (18) se pot găsi orientări detaliate privind principiile de selectare a dozei pentru studii de toxicitate cronică și carcinogenitate, precum și discuții pe această temă. Strategia de selectare a dozei de bază depinde de obiectivul principal sau obiectivele principale ale studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor de dozare adecvate trebuie să se atingă un echilibru între depistarea pericolelor, pe de-o parte, și caracterizarea răspunsurilor la doză redusă și relevanța lor, pe de altă parte. Acest lucru este relevant în special în cazul în care se efectuează un studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) (punctul 11).
11. Trebuie să se aibă în vedere efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) în locul efectuării separate a unui studiu de toxicitate cronică (această metodă de testare B.30) și a unui studiu de carcinogenitate (capitolul B.32 din prezenta anexă). Testul combinat oferă o eficiență mai mare din punct de vedere al timpului și costului, comparativ cu efectuarea a două studii separate, fără a compromite calitatea datelor din faza de toxicitate cronică sau de carcinogenitate. Cu toate acestea, trebuie să se acorde multă atenție principiilor de selectare a dozei (punctele 9 și 20-25) la efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) și se recunoaște, de asemenea, faptul că pot fi necesare studii separate în anumite cadre de reglementare.
12. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul nr. 116 (6).

## PRINCIPIUL TESTULUI

13. Substanța chimică testată este administrată zilnic, în doze graduale, mai multor grupuri de animale utilizate în scopuri experimentale, de obicei pe o perioadă de 12 luni, deși se pot alege durate mai mari sau mai scurte, în funcție de cerințele de reglementare (a se vedea punctul 33). Această durată se alege suficient de mare pentru a permite manifestarea oricăror efecte cumulative ale toxicității, fără efectele perturbatoare date de modificările geriatrice. Abaterile de la durata de expunere de 12 luni trebuie justificate, în special în cazul unor durate mai scurte. De obicei, substanța chimică testată se administrează pe cale orală, deși poate fi adecvată testarea prin inhalare sau pe cale cutanată. Protocolul studiului include, de asemenea, una sau mai multe sacrificări pe parcurs, de exemplu la 3 și 6 luni, și se pot include grupuri suplimentare de animale, pentru a lua în considerare aceasta (a se vedea punctul 19). În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă, în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în cursul testului trebuie să fie supuse unei autopsii, iar la încheierea testului se eutanasează și se autopsiază animalele care au supraviețuit.

▼ **M4****DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

14. Această metodă de testare acoperă, în principal, evaluarea toxicității cronice la rozătoare (a se vedea punctul 2), deși se recunoaște faptul că pot fi necesare studii similare pe nerozătoare, în cadrul anumitor regimuri de reglementare. Alegerea speciei trebuie să fie justificată. Protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică pe specii de nerozătoare, în cazul în care sunt necesare, se bazează pe principiile subliniate în această metodă de testare și pe cele din capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (5). Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).
15. În această metodă de testare, specia preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Șobolanii și șoarecii au fost modelele experimentale preferate din cauza duratei lor de viață relativ scurte, utilizării lor pe scară largă în studii de farmacologie și toxicologie, receptivității lor la inducerea tumorilor și disponibilității unor sușe cu nivel suficient de caracterizare. Ca o consecință a acestor caracteristici, este disponibil un volum mare de informații privind fiziologia și patologia lor. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Studiul de toxicitate cronică trebuie efectuat pe animale din aceeași sușă și sursă cu cele folosite în studiile preliminare de toxicitate, de durată mai scurtă. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

16. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; se ia în considerare adăpostirea individuală a animalelor doar dacă există o justificare științifică (19) (20) (21). Cuștile trebuie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Temperatura camerei în care se află animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, furnizându-se o cantitate nelimitată de apă potabilă. Regimul alimentar trebuie să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei testate, iar conținutul de contaminanți alimentari care ar putea influența rezultatul testului, printre care reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fitoestrogeni, metale grele și micotoxine, dar fără limitare la acestea, trebuie să fie cât mai redus posibil. Informațiile analitice privind nutrienții și nivelurile de contaminanți din regimul alimentar trebuie să fie generate periodic, cel puțin la începutul studiului și atunci când există o modificare a grupului folosit, și trebuie să fie incluse în raportul final. În mod similar, trebuie să se furnizeze informații analitice privind apa potabilă folosită în cadrul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor, în cazul administrării substanței chimice testate prin alimentație.

**Pregătirea animalelor**

17. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. În cazul rozătoarelor, administrarea trebuie să înceapă cât mai curând posibil după înțarcare și aclimatizare și, preferabil, înainte de vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele testate trebuie să se precizeze specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, variațiile de greutate între animalele utilizate pentru fiecare sex

**▼M4**

trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie a tuturor animalelor din cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. După randomizare, nu trebuie să existe diferențe semnificative între greutatea corporală medii ale grupurilor din cadrul fiecărui sex. În cazul în care există diferențe semnificative statistic, se repetă etapa de randomizare, dacă este posibil. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare și este marcat permanent cu acest număr prin tatuare, implantare de microcip sau altă metodă adecvată.

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

18. Se folosesc ambele sexe. Trebuie să se utilizeze un număr suficient de animale astfel încât la încheierea studiului să fie disponibile suficiente animale în fiecare grup pentru evaluarea biologică și statistică adecvată. Pentru rozătoare, de obicei se folosesc minimum 20 de animale din fiecare sex și grup, la fiecare nivel de dozare, iar pentru nerozătoare se recomandă minimum 4 animale din fiecare sex și grup. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale suplimentare în fiecare grup de doză, pentru efectuarea tuturor determinărilor hematologice necesare.

**Sacrificări pe parcurs, grupuri satelit și animale santinelă**

19. Studiul poate prevedea sacrificări pe parcurs (minimum 10 animale/sex/lot), de exemplu la 6 luni, pentru a asigura informații privind evoluția modificărilor toxicologice și informații mecaniciste, dacă există justificare științifică. În cazul în care asemenea informații sunt deja disponibile din studii anterioare de toxicitate la doză repetată pentru substanța chimică testată, este posibil ca sacrificările pe parcurs să nu fie justificate din punct de vedere științific. Pot fi incluse grupuri satelit pentru monitorizarea reversibilității modificărilor toxicologice induse de substanța chimică testată studiată; de obicei, acestea se limitează la nivelul cel mai ridicat al dozei plus grupul martor. De asemenea, în timpul studiului se poate include un grup suplimentar de animale santinelă (de obicei, 5 animale din fiecare sex), pentru monitorizarea stării de boală, dacă este necesar (22). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs sau includerea de grupuri satelit sau santinelă, numărul de animale prevăzute în protocolul studiului trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de sfârșitul testului. În mod normal, aceste animale trebuie să fie supuse acelorași observații, incluzând greutatea corporală, consumul de hrană/apă, măsurători hematologice și de biochimie clinică și investigații patologice, ca și animalele din studiul de toxicitate cronică, dar se poate prevedea (la grupurile de animale sacrificate pe parcurs) faptul că măsurătorile se limitează la indicatori de bază, specifici, cum ar fi neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea.

**Grupuri de doze și dozare**

20. În Ghidul nr. 116 (6) sunt furnizate orientări privind toate aspectele legate de selectarea dozelor și intervalele dintre nivelurile de dozare. Se utilizează minimum trei niveluri de dozare și un grup martor în paralel, în afara cazului în care se efectuează un test la valori-limită (a se vedea punctul 27). De regulă, nivelul dozelor se stabilește în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată pe termen mai scurt sau ale studiilor preliminare și trebuie să ia în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțe înrudite.

## ▼M4

21. Cu excepția situației în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, cel mai mare nivel de dozare se alege, de regulă, pentru a identifica principalele organe-țintă și efectele toxice, evitându-se în același timp suferința, toxicitatea severă, morbiditatea sau moartea. Luând în considerare factorii prezentați la punctul 22 de mai jos, nivelul cel mai mare de dozare se alege pentru a produce dovezi de toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %).
22. Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), se poate alege o doză maximă mai mică decât doza care furnizează dovada toxicității, de exemplu, în cazul în care o doză provoacă un efect advers îngrijorător care totuși are un efect redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale. Doza maximă nu trebuie să depășească 1 000 mg/kg greutate corporală/zi (doza-limită, a se vedea punctul 27).
23. Nivelurile dozelor și intervalul între nivelurile de dozare se pot alege astfel încât să se stabilească o relație doză-răspuns și un NOAEL sau alt rezultat intenționat al studiului, de exemplu o BMD (a se vedea punctul 25) la nivelul dozei minime. Printre factorii care trebuie să fie luați în considerare la stabilirea dozelor inferioare se numără panta anticipată a curbei doză-răspuns, dozele la care se pot produce modificări importante în metabolism sau în modul de acțiune toxică a substanței, nivelul la care se anticipează un prag sau nivelul la care este anticipat punctul de pornire pentru extrapolarea la doză redusă.
24. Intervalele dintre nivelurile de dozare vor depinde de caracteristicile substanței chimice testate și nu pot fi prescrise în această metodă de testare, dar o performanță bună a testului se obține în mod frecvent cu un factor de 2 până la 4 la formarea seriei descrescătoare a dozelor, iar adăugarea unui al patrulea grup de probă este adesea preferabilă folosirii unor intervale cu factori foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze. În general trebuie să se evite utilizarea unor factori peste 10 și, în cazul în care sunt utilizați, trebuie să se prezinte justificarea.
25. Așa cum se arată în Ghidul nr. 116 (6), aspectele care trebuie luate în considerare la selectarea dozei includ:
  - neliniarități sau puncte de inflexiune cunoscute sau presumptive în relația doză-răspuns;
  - aspecte toxicocinetice și intervale ale dozelor în care intervin sau nu intervin inducția metabolică, saturația sau neliniaritatea între dozele externe și interne;
  - leziuni precursoare, marcatori de efect sau indicatori ai acțiunii unor procese biologice de bază;
  - aspecte de bază (sau presumptive) ale modului de acțiune, de exemplu doze la care începe să apară citotoxicitatea, la care sunt perturbate nivelurile hormonale, la care sunt excedate mecanismele homeostazice etc.;
  - regiunile curbei doză-răspuns unde este necesară o estimare deosebit de precisă, de exemplu în domeniul BMD anticipate sau al unui prag anticipat;
  - considerații privind nivelurile de expunere umană anticipate.

## ▼M4

26. Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței testate se utilizează un vehicul. Cu excepția administrării substanței chimice testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum de vehicul utilizat pentru grupurile de dozare. Dacă substanța chimică testată se administrează în hrană și determină diminuarea semnificativă a consumului de hrană din cauza savorii reduse, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel.
27. Atunci când se poate anticipa, pe baza informațiilor din studiile preliminare, că un test efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodele de testare descrise pentru acest studiu, este improbabil să producă efecte adverse și dacă nu este anticipată toxicitatea în baza datelor existente pentru substanțe înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Se poate aplica o limită de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

**Pregătirea dozelor și administrarea substanței chimice testate**

28. Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, prin alimente ori apa potabilă, sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6). Alegerea căii și metodei de administrare depinde de scopul studiului, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate, de biodisponibilitatea sa și de calea și metoda de expunere predominante în cazul omului. Trebuie să se prezinte justificarea pentru calea și metoda de administrare alese. Din rațiuni care țin de bunăstarea animalelor, gavajul oral se alege, de obicei, doar pentru acei agenți la care această cale și metodă de administrare reprezintă, în mod rezonabil, o expunere umană potențială (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțe din hrană sau mediu, inclusiv pesticide, administrarea se face, de obicei, prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile. Cu toate acestea, pentru unele scenarii, de exemplu expunerea ocupațională, pot fi mai adecvate alte căi de administrare.
29. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței chimice testate, care i-ar putea afecta caracteristicile toxice; efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Trebuie să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței chimice testate și omogenitatea soluțiilor sau regimurilor alimentare (după caz) în condițiile administrării (de exemplu, prin hrană).
30. În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. În studiile de toxicitate pe termen lung folosind administrarea prin hrană, concentrația substanței testate în hrană nu trebuie să depășească, de obicei, o limită superioară de 5 % din totalul regimului alimentar, pentru a evita dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată este administrată în alimente, se poate folosi fie o concentrație constantă în hrană (mg/kg alimente sau ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului (mg/kg greutate corporală), calculată săptămânal. Trebuie să se precizeze alternativa utilizată.

## ▼ M4

31. În cazul administrării orale, animalele primesc zilnic doza de substanță chimică testată (șapte zile pe săptămână), de obicei pe o perioadă de 12 luni (a se vedea și punctul 33), deși poate fi necesară o durată mai mare, în funcție de cerințele de reglementare. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie să fie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt tratate de obicei cu substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, așa cum se specifică în capitolul B.9 din prezenta anexă (10), pe o perioadă de 12 luni. Expunerea prin inhalare se face timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar se poate folosi și expunerea timp de 5 zile pe săptămână, dacă este justificată. Perioada de expunere va fi, de obicei, de 12 luni. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii, doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. În cazul în care durata expunerii este sub 6 ore pe zi, trebuie să se prezinte o justificare. A se vedea și capitolul B.8 din prezenta anexă (8).
32. Când substanța chimică testată este administrată prin gavaj, ea se administrează animalelor folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la momente similare în fiecare zi. De obicei, se administrează o doză unică, o dată pe zi; în cazul în care o substanță are efect iritant local, rata dozei zilnice poate fi menținută prin administrare ca doză fracționată (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului testat. Volumul se menține cât mai redus posibil și de obicei nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală pentru rozătoare (22). Variațiile volumului administrat trebuie să fie reduse la minimum prin modificarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele potențial corozive sau iritante constituie o excepție și trebuie diluate pentru a evita efecte locale grave. Trebuie să se evite testarea la concentrații potențial corozive pentru tractul gastrointestinal.

**Durata studiului**

33. În principal, această metodă de testare este concepută ca studiu de toxicitate cronică pe 12 luni, dar protocolul permite și se poate aplica unor studii cu durate mai scurte (de exemplu, 6 la 9 luni) sau mai lungi (de exemplu, 18 la 24 de luni), în funcție de cerințele regimurilor de reglementare specifice sau în scopuri mecaniciste specifice. Abaterile de la durata de expunere de 12 luni trebuie să fie justificate, în special în cazul unor durate mai scurte. Grupurile satelit incluse pentru monitorizarea reversibilității modificărilor toxicologice induse de substanța chimică testată trebuie să fie menținute fără administrare de doze pe o perioadă de minimum 4 săptămâni și nu mai mult de o treime din durata totală a studiului după încetarea expunerii. Orientări suplimentare, inclusiv considerații privind supraviețuirea în cadrul studiului, sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).

**OBSERVAȚII**

34. Toate animalele trebuie să fie examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv în zilele de weekend și sărbători. Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după dozare, în cazul administrării prin gavaj.

▼ **M4**

35. Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor, cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și la sfârșitul primei săptămâni de studiu, apoi o dată pe lună. Protocolul pentru observații trebuie organizat astfel încât variațiile între observatorii independenți să fie minimizate și independente de grupul de testare. Aceste observații se recomandă să fie făcute în afara cuștii, de preferință într-o încălț standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele trebuie să fie consemnate cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Trebuie acționat astfel încât să se asigure că variațiile privind condițiile de observare sunt minime. Simptomele observate includ modificări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția secrețiilor și excrețiilor, precum și activitatea autonomă (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilelor, respirație neobișnuită), fără limitare la acestea. Trebuie să fie consemnate, de asemenea, schimbările apărute în mers, ținută și răspunsul la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi) (24).
36. Toate animalele sunt supuse unei examinări oftalmologice cu ajutorul unui oftalmoscop sau a unui echipament similar, înainte de prima administrare a substanței testate. La încheierea studiului, această examinare se face, de preferință, la toate animalele, dar trebuie făcută cel puțin la grupurile cu doză de nivel mare și grupurile martor. Dacă se constată modificări ale ochilor legate de tratament, toate animalele trebuie să fie examinate. În cazul în care analiza structurală sau alte informații sugerează toxicitate oculară, se mărește frecvența examinărilor oculare.
37. Pentru substanțe chimice testate la care testele anterioare de toxicitate la doză repetată de 28 și/sau 90 de zile au indicat potențialul de a produce efecte neurotoxice, se pot face opțional evaluări ale reactivității senzoriale la stimuli de diferite tipuri (24) (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (25) (26) (27), evaluarea forței prehensile (28) și evaluarea activității motorii (29) înainte de începerea studiului și la perioade de 3 luni de la începerea studiului, până la 12 luni inclusiv, precum și la terminarea studiului (dacă durează mai mult de 12 luni). Detalii suplimentare referitoare la procedurile de urmat sunt prezentate în referințele bibliografice respective. Se pot folosi și metode diferite de cele menționate.
38. Pentru substanțe chimice testate la care testele anterioare de toxicitate la doză repetată de 28 și/sau 90 de zile au indicat potențialul de a produce efecte imunotoxice, se pot efectua opțional la finalizare investigații suplimentare privind acest efect.

**Greutatea corporală, consumul de hrană și apă și eficiența hranei**

39. Toate animalele se cântăresc la începutul tratamentului, cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună după aceea. Măsurătorile consumului de hrană și ale eficienței hranei se fac cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior, în cazul în care substanța este administrată în apa potabilă. Măsurătorile consumului de apă se iau în considerare și la studiile în care băutul apei suferă modificări.



▼ **M4****Hematologia și biochimia clinică**

40. La studiile pe rozătoare, examinările hematologice se fac pe minimum 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, la 3, 6 și 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă durează mai mult de 12 luni), folosind întotdeauna aceleași animale. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale satelit pentru efectuarea tuturor determinărilor hematologice necesare (a se vedea punctul 18). La studiile pe nerozătoare, probele se vor preleva de la mai puține animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și grup, la studiile pe câini), la momente intermediare de prelevare și la încheiere, așa cum s-a arătat pentru rozătoare. Măsurătorile la 3 luni, atât pentru rozătoare cât și pentru nerozătoare, nu trebuie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra parametrilor hematologici la studiul anterior de 90 de zile, efectuat la doze de niveluri comparabile. Probele de sânge sunt prelevate dintr-un punct determinat, de exemplu prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital, sub anestezie.
  
41. Se investighează următoarea listă de parametri (30): numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de eritrocite, numărul de plachete, concentrația hemoglobinei, hematocritul, volumul corpuscular mediu (MCV), concentrația medie de hemoglobină corpusculară (MCHC), timpul de protrombină și timpul de protrombină parțial activat. Alți parametri hematologici, de exemplu corpii Heinz sau morfologia atipică a eritrocitelor sau methemoglobina, se pot măsura, după caz, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În ansamblu, se adoptă o abordare flexibilă, în funcție de efectul observat și/sau anticipat al unei anumite substanțe chimice testate. În cazul în care substanța chimică testată are vreun efect asupra sistemului hematopoietic, se mai pot indica numărul de reticulocite și citologia măduvei osoase, dar aceste examinări nu trebuie să fie efectuate în mod obișnuit.
  
42. Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, a efectelor asupra rinichiului și ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la cel puțin 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, la aceleași intervale cu cele specificate pentru investigațiile hematologice, folosind întotdeauna aceleași animale. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale satelit pentru efectuarea tuturor determinărilor de biochimie clinică necesare. La studiile pe nerozătoare, probele se vor preleva de la mai puține animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și grup, la studiile pe câini), la momente intermediare de prelevare și la încheiere, așa cum s-a arătat pentru rozătoare. Măsurătorile la 3 luni, atât pentru rozătoare cât și pentru nerozătoare, nu trebuie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra parametrilor de biochimie clinică la studiul anterior de 90 de zile efectuat la doze de niveluri comparabile. Se recomandă privarea de hrană a animalelor pe timpul nopții (cu excepția șoarecilor) înainte de prelevarea probelor de sânge. Se investighează parametrii din lista următoare (30): glucoză, uree (azot ureic), creatinină, proteină totală, albumină, calciu, sodiu, potasiu, colesterol total, cel puțin două teste adecvate pentru evaluarea hepatocelulară (alanin aminotransferază, aspartat alanin aminotransferază, glutamat dehidrogenază, acizi biliari totali) (31) și cel puțin două teste adecvate pentru evaluarea hepatobiliară (fosfatază alcalină, gama-glutamyl transferază, 5'-nucleotidază, bilirubină totală, acizi biliari totali) (31). Alți parametri biochimici, de exemplu trigliceridele à jeun, hormonii specifici și colinesteraza se pot măsura, după caz, în funcție de toxicitatea substanței testate. În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de efectele constatate și scontate ale substanței testate în cauză.



▼ **M4**

43. Determinările de analize urinare se efectuează pe cel puțin 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, pe probe recoltate la aceleași intervale ca pentru analizele hematologice și biochimice. Măsurătorile la 3 luni nu trebuie să fie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra analizei de urină la studiul anterior de 90 de zile efectuat la doze de niveluri comparabile. Următoarea listă de parametri a fost inclusă într-o recomandare a experților privind studiile de patologie clinică (30): aspect, volum, osmolalitate sau densitate, pH, proteină totală și glucoză. Alte determinări includ corpi cetoni, urobilinogen, bilirubină și hemoragii oculute. Se pot folosi și alți parametri, dacă este necesar să se extindă investigarea efectului (efectelor) observat(e).
44. De regulă, se consideră că, pentru studiile pe câini, variabilele de referință ale parametrilor hematologici și biochimici sunt necesare înainte de tratament, dar acestea nu trebuie determinate în cazul studiilor pe rozătoare (30). Cu toate acestea, dacă datele de referință istorice (a se vedea punctul 50) sunt necorespunzătoare, trebuie să se aibă în vedere generarea unor asemenea date.

**Patologia***Autopsia*

45. În mod normal, toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Cu toate acestea, se poate prevedea (la grupurile de sacrificare pe parcurs sau satelit) ca măsurătorile să se limiteze la indicatori de bază specifici, de exemplu neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea (a se vedea punctul 19). Aceste animale nu trebuie supuse autopsiei și procedurilor ulterioare descrise la punctele următoare. Animalele santinelă pot necesita autopsierea, de la caz la caz, decizia fiind la aprecierea conducătorului studiului.
46. Se măsoară greutatea organelor pentru toate animalele, în afară de cele excluse conform ultimei părți a punctului 45. Glandele suprarenale, creierul, epididimul, inima, rinichii, ficatul, ovarele, splina, testiculele, glanda tiroidă (cântărită după fixare, cu glandele paratiroide) și uterul fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și/sau a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite în stare proaspătă, cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea. La studiile pe șoareci, cântărirea glandelor suprarenale este opțională.
47. Următoarele țesuturi se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat pentru țesut și pentru examinarea histopatologică ulterioară intenționată (32) (țesuturile trecute între paranteze pătrate sunt opționale):

|  |                                  |                    |  |
|--|----------------------------------|--------------------|--|
| toate leziunile macroscopice   | inimă                            | pancreas           | stomac (stomacul anterior, stomacul glandular) |
| glande suprarenale   | ileon                            | glande paratiroide | [dinți]  |
| aortă  | jejun                            | nervi periferici   | testicule                                      |
| creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte) | rinichi                          | hipofiză           | timus  |
| cec  | glande lacrimale (extraorbitale) | prostată           | tiroidă  |
| col uterin   | ficat                            | rect               | [limbă]  |

## ▼ M4

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| glande coagulante                                       | plămân   | glande salivare   | trahee  |
| colon   | noduli limfatici (superficiali și de profunzime)   | veziculă seminală   | vezică urinară  |
| duoden  | glande mamare (obligatoriu pentru femele și, dacă se pot diseca vizibil, de la masculi)  | mușchi scheletici   | uter (inclusiv colul uterin)                                |
| epididim  | [căi respiratorii superioare, inclusiv nasul, cornetele nazale și sinusurile paranasale] | piele   | [ureter]  |
| ochi (inclusiv retina)                                  | esofag   | măduva spinării (la trei niveluri: cervical, toracic și lombar) | [uretră]  |
| [femur cu articulație]                                  | [bulb olfactiv]  | splină  | vagin   |
| vezica biliară (pentru alte specii în afară de șobolan) | ovar   | [stern],  | secțiune de măduvă osoasă și/sau aspirat proaspăt de măduvă |
| glandă lacrimală  |  |   |   |

În cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se conservă ambele organe. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, se păstrează lista organelor specificată pentru calea orală și este esențială prelevarea specifică și conservarea pielii de la locul de aplicare. În studiile de inhalare, lista de țesuturi conservate și examinate din căile respiratorii urmează recomandările capitolului B.8 din prezenta anexă (8) și ale capitolului B.29 din prezenta anexă (9). Pentru alte organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specific din căile respiratorii) se examinează lista organelor specificate pentru calea de administrare orală.

#### Examenul histopatologic

48. Sunt disponibile orientări privind cele mai bune practici în desfășurarea studiilor de patologie toxicologică (32). Examinările histopatologice minime sunt:

- toate țesuturile din grupurile tratate cu doza maximă și din grupurile martor;
- toate țesuturile de la animalele care au murit sau au fost sacrificate în cursul studiului;
- toate țesuturile prezentând anomalii macroscopice;
- țesuturile-țintă sau țesuturile care au prezentat modificări legate de tratamentul din grupul tratat cu doză maximă, de la toate animalele din toate grupurile pentru celelalte doze;
- în cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, trebuie să se examineze ambele organe.

**▼ M4****DATE ȘI RAPORT****Date**

49. Se furnizează date individuale despre animale pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup testat indicându-se numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umane și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor ce prezintă leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune. Tabelele cu date sumare prezintă mediile și deviațiile standard (pentru date de testare continue) la animalele care prezintă efecte toxice sau leziuni, plus clasificarea leziunilor.
50. Datele istorice de control pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu în cazul în care există indicații că datele provenite de la grupurile martor studiate în paralel nu sunt în concordanță, într-o măsură substanțială, cu datele recente de la animale din grupul martor din aceeași unitate/colonie de testare. În cazul în care sunt evaluate, datele istorice de control se transmit de la același laborator și se referă la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă cu cele generate în cursul unei perioade de cinci ani înainte de studiul în cauză.
51. Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de concepție a studiului (punctul 8). Selecția ia în considerare ajustări în funcție de supraviețuire, dacă este necesar.

**Raportul de testare**

52. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

*Substanța chimică testată:*

- natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare;
- sursa substanței;
- numărul lotului;
- certificatul de analiză chimică.

*Vehiculul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

*Animalele testate:*

- specia/sușa folosite și justificarea alegerii făcute;
- numărul, vârsta și sexul animalelor la începutul testului;

**▼ M4**

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

*Condițiile de testare:*

— justificarea căii de administrare și a dozelor alese;

— dacă este cazul, metodele statistice folosite pentru analiza datelor;

— detalii privind formularea/includerea în hrană a substanței testate;

— date analitice privind concentrația atinsă, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— calea de administrare și detalii privind administrarea substanței testate;

— pentru studiile de inhalare, dacă expunerea a fost în zona nasului sau a întregului corp;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa potabilă (mg/kg sau ppm) la doza reală, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

*Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele):*

— date privind supraviețuirea;

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană, calcule privind eficiența hranei, dacă s-au efectuat, precum și consumul de apă, dacă este cazul;

— rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și niveluri ale dozelor, inclusiv simptome de toxicitate;

— natura, incidența (și, dacă s-a evaluat, gravitatea) și durata semnelor clinice (dacă sunt reversibile sau permanente);

— rezultatele examenului oftalmologic;

— teste hematologice;

— teste de biochimie clinică;

— analize de urină;

— rezultatele tuturor investigațiilor de neurotoxicitate sau imunotoxicitate;

— greutatea corporală finală;

— greutatea organelor (și rapoartele lor, dacă este cazul);

— concluziile autopsiei;

— o descriere detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice în legătură cu tratamentul;

— date referitoare la absorbție, dacă este cazul.

**▼ M4**

*Interpretarea statistică a rezultatelor, după caz.*

*Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:*

- relații doză-răspuns;
- considerarea tuturor informațiilor privind modul de acțiune;
- discutarea tuturor abordărilor privind modelarea;
- determinarea valorilor BMD, NOAEL sau LOAEL;
- date istorice de control;
- relevanța pentru om.

*Concluzii.*

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208.
- (3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.
- (4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (5) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.
- (6) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (7) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 zile”.
- (9) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.
- (10) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.
- (11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.
- (12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

## ▼M4

- (14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.
- (15) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, JO L 276, 20.10.2010, p. 33.
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, Journal of Applied Toxicology 21:15-23.
- (24) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.
- (26) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.
- (27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.
- (28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.
- (29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

**▼M4**

- (30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ **M4**

*Apendicele 1*

DEFINIȚIE

**Substanță chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.



**▼B****B.31. STUDIUL DE TOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII INTRAUTERINE****1. METODĂ**

Această metodă corespunde Orientării 414 (2001) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Această metodă de testare a toxicității asupra dezvoltării intrauterine este concepută pentru a furniza informații generale privind efectele expunerii prenatale asupra animalelor de experiență gestante și asupra dezvoltării intrauterine a organismului; printre acestea se pot număra evaluarea efectelor asupra mamei, precum și moartea, anomalii structurale sau modificările de creștere la fetoș. Deficiențele funcționale, deși constituie o parte importantă a dezvoltării, nu sunt incluse în această metodă de testare. Ele pot face obiectul unui studiu separat sau al unei completări a acestui studiu, utilizând metoda privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării. Pentru informații privind testarea deficiențelor funcționale și alte efecte postnatale se consultă Metoda de testare a toxicității asupra funcției de reproducere la două generații și studiul privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării, după caz.

Este posibil să fie necesară o adaptare a acestei metode de testare la cazurile individuale, pe baza cunoștințelor specifice privind, de exemplu, proprietățile fizico-chimice sau toxicologice ale substanței de testat. Astfel de adaptări sunt acceptabile, în cazurile în care date științifice concludente sugerează că adaptarea va conduce la obținerea mai multor informații din test. În acest caz, datele științifice se documentează în detaliu în raportul studiului.

**1.2. DEFINIȚII**

**Toxicologia dezvoltării:** studiul efectelor adverse asupra organismului în curs de dezvoltare care ar putea fi provocate de expunerea înainte de concepție, în cursul dezvoltării intrauterine sau postnatal, până în momentul maturizării sexuale. Principalele manifestări ale toxicității dezvoltării sunt (1) moartea organismului, (2) o anomalie structurală, (3) o modificare a creșterii și (4) o deficiență funcțională. Până acum, toxicitatea dezvoltării a fost denumită deseori teratologie.

**Efect advers:** orice deviere de la situația de referință care are legătură cu tratamentul și care scade abilitatea unui organism de a supraviețui, de a se reproduce sau de a se adapta la mediu. În ceea ce privește toxicologia dezvoltării, în sensul său cel mai larg, aceasta include orice efect care interferează cu dezvoltarea normală a produsului de concepție atât înainte, cât și după naștere.

**Modificare a creșterii:** o modificare care afectează un organ, greutatea sau dimensiunea corporale ale descendentului.

**Modificări (anomalii):** modificări structurale în dezvoltare, care includ malformații și variații (28).

**Malformație/Anomalie majoră:** modificare structurală considerată dăunătoare animalului (poate fi chiar letală) și, de obicei, rară.

**▼ B**

**Variație/Anomalie minoră:** modificare structurală considerată puțin sau deloc dăunătoare animalului; poate fi temporară și poate interveni relativ frecvent la populația martor.

**Produs de concepție:** ansamblul produselor unui ovul fecundat în orice stadiu de dezvoltare, de la fertilizare până la naștere, inclusiv membranele extra-embionare, precum și embrionul sau fetusul.

**Implantare (nidație):** atașarea blastocistului în membrana epitelială a uterului, inclusiv penetrarea sa prin epiteliul uterin, și fixarea sa în endometru.

**Embrion:** stadiul precoce sau de dezvoltare al oricărui organism, în special produsul în curs de dezvoltare al fertilizării unui ovul după apariția axei longitudinale și până la apariția tuturor structurilor majore.

**Embriotoxicitate:** nocivitate pentru structura, dezvoltarea, creșterea și/sau viabilitatea normale ale unui embrion.

**Fetus:** descendentul nenăscut în perioada post-embriionară.

**Fetotoxicitate:** nocivitate pentru structura, dezvoltarea, creșterea și/sau viabilitatea normale ale unui fetus.

**Avort:** expulzarea prematură din uter a unui produs de concepție: a embrionului sau a unui fetus neviabil.

**Resorbție:** fenomenul prin care un produs de concepție care a decedat după implantarea în uter este sau a fost resorbit.

**Resorbție precoce:** dovada implantării fără un embrion/fetus detectat.

**Resorbție tardivă:** embrion sau fetus decedat cu modificări externe degenerative.

**NOAEL:** abreviere pentru nivelul dozei fără efect advers (*no-observed-adverse-effect level*); cel mai ridicat nivel al dozei sau al expunerii la care nu se observă efecte adverse provocate de tratament.

### 1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Niciuna.

### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

În mod normal, substanța de testat se administrează animalelor gestante cel puțin de la implantare până în ziua anterioară celei planificate pentru sacrificare, care se stabilește cât mai aproape posibil de ziua normală a fătării fără să existe riscul de pierdere a datelor din cauza unei fătări premature. Metoda de testare nu are ca scop doar studierea perioadei de organogeneză (de exemplu, zilele 5-15 la rozătoare și zilele 6-18 la iepure), ci și examinarea efectelor din perioada de preimplantare, dacă este cazul, pe întreaga durată a perioadei de gestație, până în ziua anterioară cezarienei. Cu scurt timp înainte de cezariană, se sacrifică femelele, se examinează conținutul uterin și se examinează feteșii pentru detectarea anomaliilor externe vizibile și a modificărilor țesuturilor moi și ale scheletului.

**▼B****1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.5.1. Selectarea speciei de animale**

Se recomandă ca testele să se efectueze pe specia cea mai relevantă și să se utilizeze specii și sușe de laborator care sunt cel mai des utilizate în teste privind toxicitatea asupra dezvoltării intrauterine. Specia preferată de rozătoare este șobolanul, iar specia preferată de nerozătoare este iepurele. Dacă se utilizează altă specie, decizia se motivează.

**1.5.2. Condiții de adăpostire și de hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență, se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm 3$  °C) pentru rozătoare și de 18 °C ( $\pm 3$  °C) pentru iepuri. Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Deși este de preferat adăpostirea individuală a animalelor împerecheate, adăpostirea în grupuri puțin numeroase este, de asemenea, acceptabilă.

**1.5.3. Pregătirea animalelor**

Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 5 zile înainte și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Pentru animalele de experiență se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și/sau vârsta. Se recomandă ca animalele din toate grupurile testate să aibă, în cea mai mare măsură posibilă, greutate și vârstă apropiate. La fiecare nivel al dozei se utilizează femele adulte tinere, nulipare. Femelele se împerechează cu masculi din aceeași specie și sușă, evitându-se împerecherile între animale cosangvine. La rozătoare, ziua 0 de gestație este ziua în care se observă un dop vaginal și/sau spermă; la iepuri, ziua 0 de gestație este, de obicei, ziua copulației sau a însămănțării artificiale, dacă se utilizează această tehnică. Femelele împerecheate se distribuie la întâmplare în grupurile martor și de tratament. Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea lor să fie reduse la minimum. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare. Femelele împerecheate se distribuie la întâmplare în grupurile martor și de tratament, iar dacă împerecherea se face în loturi, animalele din același lot se distribuie uniform în toate grupurile. În mod similar, femelele inseminate de același mascul se distribuie uniform în toate grupurile.

**1.6. MOD DE LUCRU****1.6.1. Numărul și sexul animalelor**

Fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de femele pentru a obține aproximativ 20 de femele cu puncte de implantare la autopsie. Grupurile cu sub 16 animale cu puncte de implantare riscă să fie inadecvate. Mortalitatea maternă nu invalidează obligatoriu studiul, cu condiția să nu depășească aproximativ 10 %.

## ▼B

1.6.2. **Pregătirea dozelor**

Dacă se folosește un vehicul sau un alt aditiv pentru facilitarea dozării, se iau în considerare următoarele caracteristici: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului și retenției sau excreției substanței de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care i-ar putea modifica caracteristicile toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării nutriționale a animalelor. Vehiculul trebuie să nu fie toxic asupra dezvoltării și să nu aibă efecte asupra reproducerii.

1.6.3. **Dozare**

În mod normal, substanța de testat se administrează zilnic de la implantare (de exemplu, ziua 5 după împerechere) până în ziua anterioară celei planificate pentru cezariană. În cazul în care studiile preliminare, dacă sunt disponibile, nu indică un risc ridicat de pierdere preimplantare, tratamentul poate fi extins astfel încât să includă întreaga perioadă de gestație, de la împerechere până în ziua anterioară sacrificării planificate. Este binecunoscut faptul că manipularea inadecvată și stresul în perioada gestației pot genera pierderi prenatale. Ca măsură de prevenire a pierderilor prenatale cauzate de factori fără legătură cu tratamentul, se evită manipularea inutilă a animalelor gestante, precum și stresul cauzat de factori externi, precum zgomotul.

Se utilizează cel puțin trei doze diferite și un grup martor paralel. În grupurile martor și de tratament se distribuie uniform animale sănătoase. Dozele se administrează eşalonat astfel încât efectele toxice să fie graduale. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizică/chimică sau proprietățile biologice ale substanței, doza cea mai mare se alege astfel încât să inducă toxicitate asupra dezvoltării și/sau toxicitate asupra mamei (semne clinice sau o scădere a greutatei corporale), dar nu decesul sau o suferință profundă. Cel puțin una dintre dozele intermediare trebuie să producă efecte toxice minime, observabile. Doza cea mai mică nu trebuie să producă niciun efect toxic asupra mamei sau asupra dezvoltării. Se selectează o serie descrescătoare a nivelurilor dozelor pentru a demonstra o eventuală relație doză-efect și nivelul dozei fără efect advers vizibil (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și este deseori de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze. Deși obiectivul este stabilirea unui NOAEL matern, sunt, de asemenea, acceptabile studiile care nu stabilesc un astfel de nivel (1).

Pentru selectarea nivelurilor dozelor se ține seama de datele existente privind toxicitatea, precum și de informațiile suplimentare privind metabolismul și toxicocinetica substanței de testat sau a materialelor înrudite. Informațiile în cauză se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra că regimul de dozare este adecvat.

Se utilizează un grup martor paralel. Acest grup este supus unui tratament simulat sau unui tratament exclusiv cu vehicul, în cazul în care pentru administrarea substanței se utilizează un vehicul. Tuturor grupurilor li se administrează același volum de substanță de testat sau vehicul. Animalele din grupul martor se manipulează în același fel ca animalele din grupul de tratament. Animalelor din grupurile martor tratate doar cu vehiculul li se administrează cea mai mare cantitate de vehicul utilizată (la fel ca în grupul de tratament căruia i se administrează doza cea mai mică).

**▼B****1.6.4. Testul-limită**

Dacă un test cu o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi administrată oral, utilizând procedurile descrise pentru prezentul studiu, nu produce efecte toxice observabile la animalele gestante sau descendenții acestora și dacă, pe baza datelor existente (de exemplu, date privind compuși înrudiți structural și/sau metabolic) nu se prevede niciun efect, este posibil să nu fie necesar un studiu complet cu trei niveluri ale dozei. Expunerea umană prevăzută poate indica necesitatea utilizării unui nivel mai ridicat al dozei administrate oral în testul-limită. Pentru alte căi de administrare, precum inhalarea sau aplicarea cutanată, proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat pot indica și limita, deseori, nivelul maxim de expunere care poate fi atins (de exemplu, aplicarea cutanată nu trebuie să cauzeze o toxicitate locală ridicată).

**1.6.5. Administrarea dozelor**

Substanța de testat sau vehiculul se administrează, de obicei, oral, prin intubare. În cazul în care se utilizează o altă cale de administrare, examinatorul trebuie să își justifice și să își motiveze alegerea și pot fi necesare modificări adecvate (2) (3) (4). Substanța de testat se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi.

Doza pentru animalele individuale se calculează, în mod normal, în funcție de greutatea corporală a animalului la cea mai recentă cântărire. Cu toate acestea, în ultimul trimestru al gestației, doza se calculează cu prudență. Se utilizează datele existente privind selectarea dozei, pentru a preveni o toxicitate excesivă asupra mamei. Cu toate acestea, dacă se observă o toxicitate excesivă la femelele gestante, animalele în cauză sunt eutanasiate. Dacă mai multe animale gestante prezintă semne de toxicitate excesivă, se ia în considerare sacrificarea grupului tratat cu doza respectivă. Dacă se recurge la gavaj, substanța se administrează, de preferință, într-o singură doză animalelor, printr-o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Dacă vehiculul utilizat este uleiul de porumb, volumul nu trebuie să depășească 0,4 ml/100 g greutate corporală. Se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin modificarea concentrațiilor, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor.

**1.6.6. Observarea femelelor gestante**

Observațiile clinice se efectuează și se înregistrează cel puțin o dată pe zi, de preferință în același moment (aceleași momente) ale zilei, ținând seama de perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. Se înregistrează starea animalelor, inclusiv decesul, agonia, modificările comportamentale relevante și toate semnele de toxicitate evidentă.

**1.6.7. Greutatea corporală și consumul de hrană**

Animalele se cântăresc în ziua 0 de gestație sau nu mai târziu de ziua 3 de gestație, dacă animalele împerecheate anterior sunt furnizate de către un crescător exterior, în prima zi a tratamentului, cel puțin o dată la trei zile în perioada tratamentului și în ziua planificată pentru sacrificare.

**▼B**

Consumul de hrană se înregistrează o dată la trei zile, în zilele în care se cântăresc animalele.

**1.6.8. Examinarea *post-mortem***

Femelele se sacrifică cu o zi înainte de ziua prevăzută pentru fătare. Femelele care manifestă semne de avort sau fătare prematură înainte de ziua planificată pentru sacrificare sunt sacrificate și supuse unui examen macroscopic complet.

În momentul sacrificării sau al decesului în cursul studiului, femela este examinată macroscopic pentru determinarea oricăror anomalii structurale sau modificări patologice. Evaluarea femelelor în cursul cezarienei și analizele ulterioare asupra fătului se efectuează, de preferință, fără să se cunoască grupul de tratament, pentru a se asigura un nivel maxim de imparțialitate.

**1.6.9. Examinarea conținutului uterin**

Imediat după sacrificare sau imediat ce este posibil după deces, se îndepărtează uterul și se confirmă statutul de gestație al animalelor. Uterele care nu par gestante sunt supuse unui examen suplimentar (de exemplu, prin colorare cu sulfură de amoniu la rozătoare și prin colorare Salewski sau o metodă alternativă adecvată la iepuri) pentru confirmarea absenței gestației (5).

Uterele gestante, inclusiv cervixul, se cântăresc. Nu se cântăresc uterile gestante ale animalelor care au fost găsite moarte în cursul studiului.

La animalele gestante se determină numărul de corpuri galbene.

Conținutul uterin se examinează pentru a determina numărul de embrioni sau fetoși decedați și numărul de fetoși viabili. Se descrie gradul de resorbție pentru a estima momentul relativ al decesului produsului de concepție (a se vedea punctul 1.2).

**1.6.10. Examinarea fetoșilor**

Se determină sexul și greutatea fiecărui fetus.

Se examinează fiecare fetus pentru determinarea modificărilor externe (6).

Se examinează fetoșii pentru determinarea modificărilor scheletului și ale țesuturilor moi (de exemplu, variații și malformații sau anomalii) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Este de preferat, dar nu obligatoriu, ca modificările fetale să fie înregistrate pe categorii. Dacă se stabilesc categorii, se precizează clar criteriile pentru definirea fiecărei categorii. Se examinează cu o atenție specială tractul genital pentru a se stabili dacă prezintă modificări în dezvoltare.

La rozătoare, circa jumătate din fiecare cuib se pregătește și se examinează pentru modificări ale scheletului. Restul se pregătește și se examinează pentru modificări ale țesuturilor moi, utilizând metode de secționare serială acceptate sau adecvate sau procedând cu atenție la disecția macroscopică.

**▼B**

La nerozătoare, de exemplu la iepuri, se examinează toți feteșii atât pentru modificări ale țesuturilor moi, cât și pentru modificări ale scheletului. Corpul feteșilor se evaluează prin disecție atentă pentru modificări ale țesuturilor moi, putând fi utilizate inclusiv proceduri pentru evaluarea structurii cardiace interne (25). Capetele a jumătate din feteșii examinați astfel sunt prelevate și prelucrate pentru evaluarea modificărilor țesuturilor moi (inclusiv ochi, creier, pasaje nazale și limbă), utilizând metode de secționare serială (26) sau o altă metodă la fel de sensibilă. Corpurile acestor feteși și ceilalți feteși intacti se prelucrează și se examinează pentru modificări ale scheletului, utilizând metodele descrise pentru rozătoare.

## 2. DATE

### 2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele se prezintă individual atât pentru femelele gestante, precum și pentru descendenții acestora și sub forma unui rezumat tabelar care include, pentru fiecare grup de tratament și fiecare generație, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte sau eutanasiate, momentul decesului sau al eutanasierii, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și severitatea efectelor toxice, tipurile de observații asupra embrionilor/feteșilor și toate datele relevante privind cuiburile.

Rezultatele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată, utilizând cuibul ca unitate pentru analiza datelor. Se utilizează o metodă statistică general acceptată; metodele statistice se selectează în etapa de concepere a studiului și se justifică. Se includ și datele privind animalele care nu supraviețuiesc până în ziua planificată pentru sacrificare. Datele în cauză pot fi incluse în mediile grupurilor, dacă sunt relevante. Relevanța datelor obținute de la aceste animale și, prin urmare, includerea sau excluderea lor din media (mediile) grupurilor se justifică și se analizează de la caz la caz.

### 2.2. EVALUAREA REZULTATELOR

Rezultatele studiului de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine se evaluează din punctul de vedere al efectelor observate. Evaluarea include următoarele observații:

— rezultatele testelor asupra mamelor și embrionilor/feteșilor, inclusiv evaluarea relației sau a absenței unei relații între expunerea animalelor la substanța de testat și incidența și gravitatea tuturor efectelor observate;

— criteriile utilizate pentru stabilirea unor categorii de modificări externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului la feteși, dacă s-au stabilit astfel de categorii;

**▼B**

- dacă este cazul, date istorice de control, pentru o mai bună interpretare a rezultatelor studiului;
- numerele utilizate pentru calcularea tuturor procentajelor și indicilor;
- o analiză statistică adecvată a rezultatelor studiului, dacă este cazul, inclusiv informații suficiente privind metoda de analiză pentru ca un revizor/statistician independent să poate reevalua și reface analiza.

În cazul unui studiu care demonstrează absența oricăror efecte toxice, se are în vedere efectuarea unor investigații suplimentare pentru a stabili absorbția și biodisponibilitatea substanței de testat.

### 2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Un studiu de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine furnizează informații privind efectele expunerii repetate la o substanță în timpul gestației asupra femelelor gestante și asupra dezvoltării intrauterine a descendenților lor. Rezultatele studiului se interpretează în strânsă legătură cu rezultatele altor studii de toxicitate subcronică, de toxicitate asupra reproducerii, toxicocinetice și altele. Întrucât accentul se pune pe toxicitatea generală, prin toxicitatea asupra mamei, și pe toxicitatea asupra dezvoltării intrauterine, rezultatele studiului permit, într-o anumită măsură, să se facă diferența între efectele asupra dezvoltării în absența toxicității generale și cele care sunt induse doar la nivelul care este, de asemenea, toxic pentru animalul gestant (27).

## 3. RAPORT

### 3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare include următoarele informații specifice.

Substanța de testat:

- natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;
- identificare, inclusiv numărul CAS, dacă este cunoscut/stabilit;
- puritate.

Vehicul (dacă este cazul):

- justificare pentru alegerea vehiculului, dacă acesta este diferit de apă.

Animalele de experiență:

- specie și sușă utilizate;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

- motivația pentru nivelurile dozelor alese;
- detalii privind formula/includerea în hrană a substanței de testat, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;



**▼B**

- detalii privind administrarea substanței de testat;
- transformarea concentrației de substanță de testat în hrană/apă potabilă (ppm) în doză reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- condiții ambientale;
- detalii privind calitatea hranei și a apei.

## Rezultate:

Date privind reacție toxică a femelelor gestante, în funcție de doză, inclusiv, fără a se limita la:

- numărul de animale la începutul testului, numărul de animale supraviețuitoare, numărul de animale gestante și care au avortat, numărul de animale care au născut prematur;
- ziua decesului în cursul studiului sau dacă animalele au supraviețuit până la sacrificare;
- datele privind animalele care nu supraviețuiesc până în ziua planificată pentru sacrificare se precizează, dar nu se includ în comparațiile statistice între grupuri;
- ziua observării oricărui semn clinic anormal și evoluția sa ulterioară;
- greutatea corporală, variațiile acesteia și greutatea uterului gestant, inclusiv, opțional, variațiile de greutate corporală corectate în funcție de greutatea uterului gestant;
- consumul de hrană și, dacă se măsoară, consumul de apă;
- concluziile autopsiei, inclusiv greutatea uterului;
- se raportează valorile NOAEL pentru efecte asupra femelei gestante și asupra dezvoltării.

Puncte finale pentru dezvoltare în funcție de doză pentru cuiburi cu implantări, inclusiv:

- numărul de corpuri galbene;
- numărul de implantări, numărul și procentajul de fete vii și decedați și de resorbții;
- numărul și procentajul de pierderi înainte și după implantare.

Puncte finale pentru dezvoltare în funcție de doză, pentru cuiburile cu fete vii, inclusiv:

- numărul și procentajul de descendenți vii;
- raportul între cele două sexe;
- greutatea corporală a fetușilor, de preferință defalcă pe sexe și pentru ambele sexe;
- malformații externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului și alte modificări relevante;
- criterii pentru includerea în diverse categorii, dacă este cazul;

## ▼B

— numărul total și procentajul de fetoși și cuiburi cu modificări externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului, precum și tipurile și incidențele diverselor anomalii, precum și alte modificări relevante.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Kavlock R. J. *et al.* (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
2. Kimmel, C. A. and Francis, E. Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
3. Wong, B. A., *et al.* (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT Activities* 17; 1-8.
4. US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350; Inhalation Developmental Toxicity Study.
5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
6. Edwards, J. A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
7. Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
8. Igarashi, E. *et al.* (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.
9. Kimmel, C. A. *et al.* (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229-242.
10. Marr, M. C. *et al.* (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
11. Barrow, M. V. and Taylor, W. J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291-306.
12. Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
13. Gibson, J.P. *et al.* (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.
14. Kimmel, C. A. and Wilson, J. G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
15. Marr, M. C. *et al.* (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

## ▼B

16. Monie, I. W. *et al.* (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.
17. Spark, C. and Dawson, A. B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
18. Staples, R. E. and Schnell, V. L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
19. Strong, R. M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
20. Stuckhardt, J. L. and Poppe, S. M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Muta-genesis* 4; 181-188.
21. Walker, D. G. and Wirtschafter, Z. T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
22. Wilson, J. G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J. G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 251-277.
23. Wilson, J. G. and Fraser, F. C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
24. Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
25. Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
26. Van Julsingha, E. B. and C. G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
27. US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
28. Wise, D. L. *et al.* (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.

▼ **M4****B.32. STUDII DE CARCINOGENITATE**

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 451 (2009) a OCDE. Orientarea originală 451 privind carcinogenitatea a fost adoptată în 1981. S-a considerat necesară elaborarea acestei metode de testare revizuite B.32 pentru a reflecta evoluțiile recente în domeniul bunăstării animalelor și cerințelor de reglementare (2) (3) (4) (5) (6). Actualizarea acestei metode de testare B.32 s-a realizat în paralel cu revizuirea capitolului B.30 din prezenta anexă, „Studii de toxicitate cronică”, și capitolului B.33 din prezenta anexă, „Studii combinate de toxicitate cronică și carcinogenitate”, cu obiectivul de a obține informații suplimentare de la animalele folosite în studiu și furnizând detalii suplimentare privind alegerea dozelor. Această metodă de testare B.32 este concepută pentru a fi utilizată la testarea unei game largi de substanțe, inclusiv pesticide și produse chimice industriale. Trebuie reținut însă faptul că unele detalii și cerințe pot fi diferite pentru produsele farmaceutice [a se vedea documentul „International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals”].
  
2. Majoritatea studiilor de carcinogenitate sunt efectuate pe specii de rozătoare, prin urmare, această metodă de testare este destinată în primul rând studiilor efectuate pe aceste specii. În cazul în care sunt necesare studii pe specii de nerozătoare, se aplică principiile subliniate în această metodă de testare și cele din capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6), cu modificările corespunzătoare. Orientări suplimentare sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (7).
  
3. Cele trei căi de administrare principale folosite în studiile de carcinogenitate sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței testate și de calea de expunere probabilă în cazul omului. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).
  
4. Această metodă de testare se axează pe expunerea prin intermediul căii orale, calea cea mai folosită în cadrul studiilor de carcinogenitate. Pentru evaluarea riscului pentru sănătatea umană pot fi necesare și studii de carcinogenitate implicând căi de expunere cutanată sau prin inhalare și/sau acestea pot fi necesare în cadrul anumitor regimuri de reglementare, dar aceste două căi de expunere implică o complexitate tehnică considerabilă. Asemenea studii trebuie concepute de la caz la caz, deși metoda de testare prezentată aici pentru evaluarea carcinogenității la administrare orală poate constitui baza unui protocol pentru studiile de inhalare și/sau cutanate, în legătură cu recomandările pentru perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc. Sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (7) și pe cale cutanată (7) (8). Capitolul B.8 din prezenta anexă (9) și capitolul B.29 din prezenta anexă (10), împreună cu Ghidul OCDE privind testarea toxicității acute prin inhalare (8) trebuie consultate în mod special la conceperea unor studii mai lungi implicând expunerea prin inhalare. Capitolul B.9 din prezenta anexă (11) trebuie consultat în cazul testării expunerii prin intermediul căii cutanate.

▼ **M4**

5. Studiul de carcinogenitate furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată pe o parte considerabilă a perioadei de viață a speciei utilizate. Studiul va furniza informații privind efectele toxice ale substanței testate, inclusiv potențiala carcinogenitate și poate indica organele-țintă și posibilitatea de acumulare. El poate furniza, de asemenea, o estimare a nivelului efectelor toxice la care nu se observă efecte adverse, iar în cazul agenților carcinogeni fără efect genotoxic, a nivelului răspunsurilor tumorale, informație care poate fi folosită la stabilirea criteriilor pentru expunere umană. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații posibil.
6. Obiectivele studiilor de carcinogenitate acoperite de această metodă de testare includ:
  - identificarea proprietăților carcinogene ale unei substanțe chimice testate, conducând la o incidență crescută a neoplasmelor, o proporție crescută a neoplasmelor maligne sau a reducerii timpului de apariție a neoplasmelor comparativ cu grupurile martor studiate în paralel;
  - identificarea organului (organelor) țintă pentru carcinogenitate;
  - identificarea timpului până la apariția neoplasmelor;
  - caracterizarea relației doză-răspuns a tumorii;
  - identificarea unui nivel la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL) sau a punctului de pornire pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);
  - extrapolarea efectelor cancerigene la niveluri de expunere umană cu doză redusă;
  - furnizarea de date pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (2) (7) (12) (13) (14) (15).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. În evaluarea carcinogenității potențiale a unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, înainte de efectuarea testului, pentru un protocol mai eficient al testului privind potențialul cancerigen și pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile și considerațiile privind modul de acțiune al unui prezumtiv agent carcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) sunt deosebit de importante, deoarece protocolul optim poate diferi în funcție de tipul substanței chimice testate, respectiv agent carcinogen genotoxic cunoscut sau prezumtiv. Orientări suplimentare asupra considerațiilor privind modul de acțiune se pot găsi în Ghidul nr. 116 (7).
8. Informațiile care pot contribui la protocolul studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, inclusiv teste de genotoxicitate; utilizare (utilizări) anticipată (anticipate) și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile, date de mutagenitate/genotoxicitate, carcinogenitate și alte date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; date toxicocinetice disponibile (cinetica pentru doză unică și doză repetată, acolo unde sunt disponibile) și date

## ▼ M4

rezultate din studii de expunere repetată. Evaluarea carcinogenității se efectuează doar după ce s-au obținut informațiile inițiale privind toxicitatea din testele de toxicitate la doză repetată de 28 de zile și/sau 90 de zile. Testele de inițiere-promovare a cancerului pe termen scurt pot furniza, de asemenea, informații utile. Se ia în considerare o abordare de testare pe etape a carcinogenității, ca parte a evaluării generale a potențialelor efecte adverse asupra sănătății a unei anumite substanțe chimice testate (16) (17) (18) (19).

9. Metodele statistice cele mai adecvate pentru analiza rezultatelor, protocolul experimentului și obiective se stabilesc înainte de începerea studiului. Aspectele care trebuie luate în considerare sunt, de exemplu, necesitatea ca statisticile să includă ajustarea pentru supraviețuire, analiza riscurilor cumulate privind tumorile relativ la durata de supraviețuire, stabilitatea timpului până la apariția tumorii și analiza în cazul încheierii anticipate pentru unul sau mai multe grupuri. În Ghidul nr. 116 (7) și în Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (20) sunt prezentate orientări privind analizele statistice corespunzătoare și referințe de bază la metode statistice acceptate la nivel internațional.
  
10. La efectuarea unui studiu de carcinogenitate trebuie să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile din Ghidul OCDE nr. 19 privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (21), în special punctul 62 al documentului. Acest punct stipulează că *„În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, rezultând în deteriorarea în continuare a stării, se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia include considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, se crește frecvența observărilor, după cum este necesar. Poate fi de asemenea posibil, fără a afecta negativ scopul testului, să se întrerupă temporar dozarea sau să se reducă doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința.”*
  
11. În Ghidul nr. 116 (7), precum și în două publicații ale International Life Sciences Institute (22) (23) se pot găsi orientări detaliate privind principiile de selectare a dozei pentru studii de toxicitate cronică și carcinogenitate și discuții pe această temă. Strategia de selectare a dozei de bază depinde de obiectivul principal sau obiectivele studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor de dozare adecvate trebuie să se atingă un echilibru între depistarea pericolelor, pe de-o parte, și caracterizarea răspunsurilor la doză redusă și relevanța lor, pe de altă parte. Acest lucru este relevant în special în cazul în care se efectuează un studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) (punctul 12).
  
12. Trebuie să se aibă în vedere efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) în locul efectuării separate a unui studiu de toxicitate cronică (capitolul B.30 din această metodă de testare) și a unui studiu de carcinogenitate (această metodă de testare, B.32). Testul combinat oferă o eficiență mai mare din punct de vedere al timpului și costului, comparativ cu efectuarea a două studii separate, fără a compromite calitatea datelor din faza de toxicitate cronică sau de carcinogenitate. Cu toate acestea, trebuie acordată multă atenție principiilor selectării dozei (punctele 11 și 22-25) la efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) și se recunoaște, de asemenea, că pot fi necesare studii separate în anumite cadre de reglementare.

▼ **M4**

13. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul nr. 116 (7).

**PRINCIPIUL TESTULUI**

14. Substanța chimică testată se administrează zilnic, de obicei pe cale orală, în doze graduale, câtorva grupuri de animale testate, pe cea mai mare parte din durata lor de viață. Poate fi adecvată și testarea pentru căile de expunere prin inhalare sau cutanată. Animalele sunt examinate atent în legătură cu prezența semnelor de toxicitate și cu apariția leziunilor neoplazice. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în cursul testului trebuie să fie supuse unei autopsii, iar la încheierea testului se eutanasiază și se autopsiază animalele care au supraviețuit.

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

15. Această metodă de testare acoperă, în principal, evaluarea carcinogenității la rozătoare (punctul 2). Utilizarea unor specii de nerozătoare poate fi luată în considerare în cazul în care datele disponibile sugerează că acestea sunt mai relevante pentru estimarea efectelor asupra sănătății la om. Alegerea speciei trebuie să fie justificată. Specia de rozătoare preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Deși utilizarea șoarecilor în teste de carcinogenitate poate avea o utilitate limitată (24) (25) (26), în cadrul unor programe de reglementare curente se impune testarea carcinogenității pe șoareci, în afară de cazul în care se determină faptul că asemenea studiu nu este necesar din punct de vedere științific. Șobolanii și șoarecii au fost modelele experimentale preferate din cauza duratei lor de viață relativ scurte, utilizării lor pe scară largă în studii de farmacologie în toxicologie, receptivității lor privind inducerea tumorilor și disponibilității unor sușe cu un nivel suficient de caracterizare. Ca o consecință a acestor caracteristici, este disponibil un volum mare de informații privind fiziologia și patologia lor. Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).

16. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Studiul carcinogenității se efectuează, de preferință, pe animale din aceeași sușă și sursă cu cele folosite în studiul (studiile) de toxicitate preliminară de durată mai scurtă dar, în cazul în care se știe că animalele din această sușă și sursă prezintă probleme în atingerea criteriilor de supraviețuire acceptate în mod normal pentru studiile pe termen lung [a se vedea Ghidul nr. 116 (7)], se ia în considerare utilizarea unei sușe de animale care au o rată de supraviețuire acceptabilă pentru studii pe termen lung. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante.

**Adăpostire și hrănire**

17. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; se ia în considerare adăpostirea individuală a animalelor doar dacă există o justificare științifică (27) (28) (29). Cuștile sunt aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Temperatura camerei în care se află animalele utilizate în scop experimental este de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul este artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Regimul alimentar trebuie să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei testate

▼ **M4**

iar conținutul de contaminanți alimentari care ar putea influența rezultatul testului, incluzând reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fito-estrogeni, metale grele și micotoxine, dar fără limitare la acestea, trebuie să fie cât mai redus posibil. Informațiile analitice privind nutrienții și nivelurile de contaminanți din regimul alimentar se generează periodic, cel puțin la începutul studiului și atunci când există o modificare a grupului folosit și se includ în raportul final. În mod similar, se furnizează informații analitice privind apa potabilă folosită în cadrul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor, în cazul administrării substanței testate prin alimentație.

**Pregătirea animalelor**

18. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. În cazul rozătoarelor, administrarea începe cât mai curând posibil după înțărare și aclimatizare și, preferabil, înainte de vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele testate se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, variațiile în greutate între animalele utilizate pentru fiecare sex trebuie să fie minime și să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a tuturor animalelor în cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. După randomizare, nu trebuie să existe diferențe semnificative între greutatea corporală medii ale grupurilor din cadrul fiecărui sex. În cazul în care există diferențe semnificative din punct de vedere statistic, se repetă etapa de randomizare, dacă este posibil. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare și este marcat permanent cu acest număr prin tatuare, implantare de microcip sau altă metodă adecvată.

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

19. Se folosesc ambele sexe. Se folosește un număr suficient de animale, astfel încât să fie posibilă o evaluare biologică și statistică temeinică. Prin urmare, fiecare grup de dozare și grup martor paralel trebuie să conțină minimum 50 de animale de același sex. În funcție de scopul studiului, poate fi posibil să se crească puterea statistică a estimărilor de bază, prin alocarea diferențiată a animalelor în mod inegal la diferitele grupuri de doze, cu mai mult de 50 de animale în grupurile cu doze mici; de exemplu, pentru a estima potențialul cancerigen la doze mici. Cu toate acestea, trebuie recunoscut faptul că o creștere moderată a dimensiunii grupului va produce o creștere redusă a puterii statistice a studiului. Informații suplimentare privind protocolul statistic al studiului și alegerea nivelului de dozare pentru maximizarea puterii statistice sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).

**Sacrificări pe parcurs și grupuri satelit (santină)**

20. Studiul poate prevedea sacrificări pe parcurs, de exemplu la 12 luni, pentru a asigura informații privind evoluția modificărilor neoplazice și informații mecanice, dacă există justificare științifică. În cazul în care asemenea informații sunt deja disponibile din studii anterioare de toxicitate la doză repetată asupra substanței testate, este posibil ca sacrificările pe parcurs să nu fie justificate din punct de vedere științific. În cazul în care sacrificările pe parcurs sunt incluse în protocolul studiului, numărul de animale din fiecare grup de dozare programat pentru sacrificare pe parcurs va fi, de obicei, de 10 animale din fiecare sex, iar numărul total de animale incluse în concepția studiului trebuie să se suplimenteze cu numărul de animale programate să fie sacrificate înainte de încheierea studiului. Se poate include, de asemenea, un grup suplimentar de animale santină (de obicei 5 animale din fiecare sex) pentru monitorizarea stării de boală în timpul studiului, dacă este necesar (30). Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul nr. 116 (7).



▼ **M4****Grupuri de doze și dozare**

21. În Ghidul nr. 116 (7) sunt furnizate orientări privind toate aspectele în legătură cu selectarea dozelor și intervalele dintre nivelurile de dozare. Se utilizează cel puțin trei doze diferite și un grup martor paralel. Nivelul dozelor este stabilit în general în funcție de rezultatele studiilor pe termen mai scurt cu doză repetată sau ale studiilor de stabilire a intervalului și iau în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțe înrudite.
22. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, nivelul cu doza cea mai mare se alege astfel încât să se identifice principalele organe țintă și efectele toxice, fără să se inducă suferințe, toxicitate severă, morbiditate sau moartea. Luând în considerare factorii prezentați la punctul 23 de mai jos, se alege nivelul de cea mai mare doză pentru a produce dovezi de toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %). Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), se poate alege o doză maximă mai mică decât doza care furnizează dovada toxicității, de exemplu, în cazul în care o doză provoacă un efect advers îngrijorător care are totuși un efect redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale.
23. Nivelurile dozelor și intervalul dintre nivelurile de dozare se pot alege astfel încât să se stabilească o reacție doză-răspuns și, în funcție de substanța chimică testată, un NOAEL sau un rezultat intenționat al studiului, de exemplu o BMD (a se vedea punctul 25) la nivelul dozei minime. Printre factorii care trebuie luați în considerare la stabilirea dozelor inferioare se includ panta anticipată a curbei doză-răspuns, dozele la care se pot produce modificări importante în metabolism sau în modul de acțiune toxică, nivelul la care se anticipează un prag sau nivelul la care este anticipat punctul de pornire pentru extrapolarea la doză redusă.
24. Intervalele dintre nivelurile de dozare vor depinde de caracteristicile substanței chimice testate și nu pot fi prescrise în această metodă de testare, dar o performanță bună a testului se obține în mod frecvent cu un factor de 2 până la 4 la formarea seriei descrescătoare a dozelor, iar adăugarea unui al patrulea grup de probă este adesea preferabilă folosirii unor intervale cu factori foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze. În general se evită utilizarea unor factori peste 10 și, în cazul în care sunt utilizați, trebuie să se prezinte justificarea.
25. Așa cum se arată în Ghidul nr. 116 (7), aspectele care sunt luate în considerare la selectarea dozei includ:
  - neliniarități sau puncte de inflexiune cunoscute sau prezumtive în relația doză-răspuns;
  - aspecte toxicocinetice și intervale ale dozelor în care intervin sau nu intervin inducția metabolică, saturația sau neliniaritatea între dozele externe și interne;
  - leziuni precursoare, markere de efect sau indicatori ai acțiunii unor procese biologice de bază;
  - aspecte de bază (sau prezumtive) ale modului de acțiune, de exemplu doze la care începe să apară citotoxicitatea, la care sunt perturbate nivelurile hormonale, sunt excedate mecanismele homeostazice etc.;

▼ **M4**

— regiunile curbei doză-răspuns unde este necesară o estimare deosebit de precisă, de exemplu în domeniul BMD anticipate sau al unui prag anticipat;

— considerații privind nivelurile de expunere umană anticipate.

26. Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței testate se utilizează un vehicul. Cu excepția administrării substanței chimice testate, animalele din grupul martor sunt tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum de vehicul utilizat pentru grupurile de dozare. Dacă substanța chimică testată se administrează în hrană și determină diminuarea semnificativă a consumului de hrană din savorii reduse, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel.

**Pregătirea dozelor și administrarea substanței chimice testate**

27. Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, prin alimente ori prin apa potabilă, sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7). Calea și metoda de administrare depind de scopul studiului, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței testate, de biodisponibilitatea sa și de calea și metoda de expunere predominante în cazul omului. Trebuie să se prezinte justificarea pentru calea și metoda de administrare alese. Din rațiuni care țin de bunăstarea animalelor, gavajul oral se alege, de obicei, doar pentru acei agenți la care această cale și metodă de administrare reprezintă în mod rezonabil expunerea umană (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțe din hrană sau mediu, inclusiv pesticide, administrarea se face de obicei prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile. Cu toate acestea, pentru unele scenarii, de exemplu expunerea ocupațională, pot fi mai adecvate alte căi de expunere.
28. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței testate, care i-ar putea afecta caracteristicile toxice; efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Trebuie să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței testate și omogenitatea soluțiilor sau regimurilor alimentare (după caz) în condițiile administrării (de exemplu, prin hrană).
29. În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. În studiile de toxicitate pe termen lung folosind administrarea prin hrană, concentrația substanței testate în hrană nu trebuie să depășească, de regulă, o limită superioară de 5 % din totalul regimului alimentar, pentru a evita dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată este administrată în hrană, se poate folosi fie o concentrație constantă în hrană (mg/kg alimente sau ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului (mg/kg greutate corporală), calculată săptămânal. Trebuie să se precizeze alternativa utilizată.

## ▼ M4

30. În cazul administrării orale, animalele primesc zilnic doza de substanță chimică testată (șapte zile pe săptămână), de obicei pe o perioadă de 24 de luni pentru rozătoare (a se vedea și punctul 32). Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt tratate de obicei cu substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, așa cum se specifică în capitolul B.9 din prezenta anexă (11), pe o perioadă de 24 de luni. Expunerea prin inhalare se face timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar se poate folosi și expunerea timp de 5 zile pe săptămână, dacă este justificată. Expunerea va fi de obicei pe o perioadă de 24 de luni. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. În cazul în care durata expunerii este sub 6 ore pe zi, se prezintă o justificare. A se vedea și capitolul B.8 din prezenta anexă (9).

31. Când substanța chimică testată se administrează prin gavaj, ea se administrează animalelor folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la momente apropiate în fiecare zi. De obicei se administrează o doză unică, o dată pe zi; în cazul în care, de exemplu, o substanță are efect iritant local, rata dozei zilnice poate fi menținută prin administrare ca doză fracționată (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului testat. Volumul se menține cât mai redus posibil și de obicei nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală pentru rozătoare (31). Variațiile volumului administrat trebuie reduse la minimum prin modificarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele potențial corozive sau iritante constituie o excepție și trebuie diluate pentru a evita efecte locale grave. Se evită testarea la concentrații la care este probabil să fie corozive pentru tractul gastrointestinal.

**Durata studiului**

32. De regulă, durata studiului este de 24 de luni pentru rozătoare, reprezentând cea mai mare parte a duratei de viață a animalelor utilizate. Se pot folosi durate mai scurte sau mai lungi, în funcție de durata de viață a sușei și speciei de animale utilizate în studiu, dar acestea trebuie să fie justificate. Pentru sușe specifice de șoareci, de exemplu AKR/J, C3H/J sau C57BL/6J, poate fi mai adecvată o durată de 18 luni. În continuare, se prezintă orientări privind durata studiului, încetarea sa și supraviețuirea; orientări suplimentare, inclusiv considerații privind posibilitatea de acceptare a unei carcinogenități negative în raport cu rata de supraviețuire, sunt prezentate în Ghidul nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (7).

— încheierea studiului trebuie să fie luată în considerare când numărul de supraviețuitori din grupurile cu niveluri reduse de dozare sau din grupurile martor scade sub 25 %;

— în cazul în care doar grupul cu nivel ridicat de dozare moare prematur din cauza toxicității, acest lucru nu determină încheierea studiului;

— supraviețuirea la fiecare sex este luată în considerare separat;

— studiul nu se va extinde dincolo de punctul unde datele disponibile din studiu nu mai sunt suficiente pentru a permite efectuarea unei evaluări valabile din punct de vedere statistic.

▼ **M4****OBSERVAȚII**

33. Toate animalele sunt examinate pentru a constata simptome de morbiditate și mortalitate, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv în zilele de weekend și sărbători. Animalele se examinează în plus o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, pentru simptome specifice cu relevanță toxicologică, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare, în cazul administrării prin gavaj. O atenție deosebită trebuie acordată evoluției tumorilor; se înregistrează momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea atât a tumorilor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile.

*Greutatea corporală, consumul de hrană și apă și eficiența hranei*

34. Toate animalele se cântăresc la începutul tratamentului, cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Măsurătorile consumului de hrană și ale eficienței hranei se fac cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior, în cazul în care substanța chimică testată este administrată în apa potabilă. Măsurătorile consumului de apă se iau în considerare și la studiile în care băutul suferă modificări.

*Determinările hematologice, biochimice și de alt tip*

35. Pentru maximizarea informațiilor obținute din studiu, în special pentru considerațiile privind modul de acțiune, se recoltează probe de sânge pentru analize hematologice și biochimice, la aprecierea conducătorului studiului. Poate fi indicată și analiza urinei. Orientări suplimentare privind utilitatea recoltării unor asemenea probe ca parte a studiului de carcinogenitate sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7). Dacă se consideră adecvat, recoltarea de probe de sânge pentru determinările hematologice și analiza urinei se pot efectua ca parte a unei sacrificări pe parcurs (punctul 20) și la încheierea studiului, pe minimum 10 animale din fiecare sex și grup. Probele de sânge sunt prelevate dintr-un punct determinat, de exemplu prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital, sub anestezie, și sunt păstrate, dacă este cazul, în condiții adecvate. Se pot prepara și frotiuri sangvine pentru examinare, în special dacă măduva osoasă pare a fi organul-țintă, deși s-a pus la îndoială valoarea acestei examinări pentru evaluarea potențialului carcinogen/oncogen (32).

**PATOLOGIA***Autopsia*

36. Toate animalele care participă la studiu, cu excepția animalelor sentinelă (a se vedea punctul 20) și altor animale satelit, sunt supuse unei autopsii complete, care să includă o examinare aprofundată a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavității craniene, toracice și abdominale și a conținutului acestora. Animalele sentinelă și alte animale satelit pot necesita autopsierea de la caz la caz, la aprecierea conducătorului studiului. În mod obișnuit, greutatea organelor nu face parte dintr-un studiu de carcinogeneză, deoarece modificările geriatrice și, în stadii mai târzii, formarea tumorilor, afectează utilitatea datelor privind greutatea organelor. Ele pot fi însă critice pentru o evaluare bazată pe forța probantă a datelor și, în special, pentru considerații privind modul de acțiune. În cazul în care sunt parte a unui studiu satelit, ele sunt colectate nu mai târziu de un an de la inițierea studiului.

## ▼M4

37. Următoarele țesuturi se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat pentru țesut și pentru examinarea histopatologică ulterioară intenționată (33) (țesuturile trecute între paranteze pătrate sunt opționale):

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| toate leziunile macroscopice   | inimă  | pancreas  | stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)              |
| glande suprarenale   | ileon  | glande paratiroide  | [dinți]   |
| aortă  | jejun  | nervi periferici  | testicule   |
| creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte) | rinichi  | hipofiză  | timus   |
| cec  | glandele lacrimale (extraorbitale)   | prostată  | tiroidă   |
| col uterin   | ficat  | rect  | [limbă]   |
| glande coagulante  | plămân   | glande salivare   | trahee  |
| colon  | noduli limfatici (superficiali și de profunzime)   | veziculă seminală   | vezică urinară  |
| duoden   | glande mamare (obligatoriu pentru femele și, dacă se pot diseca vizibil, de la masculi)  | mușchi scheletici   | uter (inclusiv colul uterin)                                |
| epididim   | [căi respiratorii superioare, inclusiv nasul, cornetele nazale și sinusurile paranasale] | piele   | [ureter]  |
| ochi (inclusiv retina)   | esofag   | măduva spinării (la trei niveluri: cervical, toracic și lombar) | [uretră]  |
| [femur cu articulație]   | [bulb olfactiv]  | splină  | vagin   |
| vezica biliară (pentru alte specii în afară de șobolan)                      | ovar   | [stern],  | secțiune de măduvă osoasă și/sau aspirat proaspăt de măduvă |
| glandă lacrimală   |  |   |   |

În cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se conservă ambele organe. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă, având în vedere proprietățile cunoscute ale substanței testate. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, se păstrează lista organelor specificată pentru calea orală și este esențială prelevarea specifică și conservarea pielii de la locul de aplicare. În studiile de inhalare, lista de țesuturi conservate și examinate din căile respiratorii urmează recomandările capitolelor B.8 și B.29 din prezenta anexă. Pentru alte organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specific din căile respiratorii) se examinează lista organelor specificate pentru calea de administrare orală.

**▼ M4***Examenul histopatologic*

38. Sunt disponibile orientări privind cele mai bune practici în desfășurarea studiilor de patologie toxicologică (33). Țesuturile supuse examinărilor histopatologice includ, cel puțin următoarele:

- toate țesuturile din grupurile tratate cu doza maximă și din grupurile martor;
- toate țesuturile de la animalele care au murit sau au fost sacrificate în cursul studiului;
- toate țesuturile prezentând anomalii macroscopice, inclusiv tumori;
- în cazul în care se observă modificări histopatologice în legătură cu tratamentul în grupul tratat cu doză maximă, acele țesuturi se vor examina la toate animalele din toate celelalte grupuri de dozare;
- în cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se examinează ambele organe.

**DATE ȘI RAPORT****Date**

39. Se furnizează date individuale despre animale pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup testat, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umane și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune. Tabele cu date sumare prezintă mediile și deviațiile standard (pentru date de testare continue) la animalele care prezintă efecte toxice sau leziuni, plus clasificarea leziunilor.
40. Datele istorice de control pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu în cazul în care există indicații că datele furnizate de animale din grupul martor paralel nu sunt în concordanță, într-o măsură substanțială, cu datele recente de la animale din grupul martor din aceeași unitate/colonie de testare. În cazul în care sunt evaluate, datele martor anterioare se transmit de la același laborator și se referă la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă cu cele generate în ultimii cinci ani înaintea studiului în cauză.
41. Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de concepție a studiului (punctul 9). Selecția ia în considerare ajustări pentru supraviețuire, dacă este necesar.

**Raportul de testare**

42. Raportul de testare conține următoarele date:

*Substanța chimică testată:*

- natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare;

**▼ M4**

- sursa substanței;
- numărul lotului;
- certificatul de analiză chimică.

*Vehiculul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

*Animalele testate:*

- specia/sușa folosite și justificarea alegerii făcute;
- numărul, vârsta și sexul animalelor la începutul testării;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

*Condițiile de testare:*

- justificarea căii de administrare și a dozelor alese;
- după caz, metodele statistice folosite pentru analiza datelor;
- detalii privind formularea/includerea în hrană a substanței testate;
- date analitice privind concentrația atinsă, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- calea de administrare și detalii privind administrarea substanței testate;
- pentru studiile de inhalare, dacă expunerea a fost în zona nasului sau a întregului corp;
- dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa potabilă (mg/kg sau ppm) la doza reală, dacă este cazul;
- detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

*Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele)*

*Generalități:*

- date privind supraviețuirea;
- greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;
- consumul de hrană, calcule privind eficiența hranei, dacă s-au efectuat, și consumul de apă, dacă este cazul;
- date toxicocinetice (dacă sunt disponibile);
- oftalmoscopie (dacă este disponibilă);
- examen hematologic (dacă este disponibil);
- analize de biochimie (dacă sunt disponibile).

**▼ M4***Concluziile clinice:*

- semne de toxicitate;
- incidența (și, dacă a fost evaluată, gravitatea) anomaliilor morfologice;
- natura, gravitatea și durata semnelor clinice (dacă sunt tranzitorii sau permanente).

*Datele privind autopsia:*

- greutatea corporală finală;
- greutatea organelor și rapoartele lor, dacă este cazul;
- rezultatele autopsiei; incidența și gravitatea anomaliilor.

*Examenul histopatologic:*

- rezultatele histopatologice non-neoplazice;
- rezultatele histopatologice neoplazice;
- corelația între rezultatele macroscopice și cele microscopice;
- o descriere detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice în legătură cu tratamentul, inclusiv clasificarea gravității;
- raportarea examinării lamelor de către alte echipe.

*Interpretarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.**Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:*

- discutarea tuturor abordărilor privind modelarea;
- relațiile doză-răspuns;
- date istorice de control;
- considerarea tuturor informațiilor privind modul de acțiune;
- determinarea valorilor BMD, NOAEL sau LOAEL;
- relevanța pentru om.

*Concluzii.***BIBLIOGRAFIE:**

- (1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.



## ▼M4

- (6) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.
- (7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, disponibil pe site-ul internet public al OCDE referitor la orientările privind testele, la adresa [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 de zile”.
- (10) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.
- (11) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.
- (20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

## ▼M4

- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.*, 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (ed.), ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. și Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. În D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds), *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) Weingand K. *et al.* (1996), Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ M4

*Apendicele 1*

DEFINIȚIE

**Substanța chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

## ▼M4

**B.33. STUDII COMBinate DE TOXICITATE CRONICĂ ȘI DE CARCINOGENITATE**

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 453 (2009) a OCDE. Prima orientare 453 a fost adoptată în 1981. Elaborarea acestei metode de testare B.33 actualizată a fost considerată necesară pentru a reflecta evoluțiile recente din domeniul bunăstării animalelor și ale cerințelor de reglementare (1) (2) (3) (4) (5). Actualizarea acestei metode de testare B.33 s-a realizat simultan cu revizuirea capitolelor B.32 „Studii de carcinogenitate” și B.30 „Studii de toxicitate cronică” din prezenta anexă, în vederea obținerii de informații adiționale de la animalele utilizate în studii și furnizării unor detalii suplimentare privind selectarea dozei. Această metodă de testare este destinată utilizării în testarea unei game largi de substanțe chimice, inclusiv pesticide și substanțe chimice industriale. Cu toate acestea, ar trebui avut în vedere faptul că unele detalii și cerințe pot fi diferite de cele privind produsele farmaceutice [a se vedea *International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*].
2. Majoritatea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate se desfășoară pe specii de rozătoare, această metodă de testare fiind destinată în primul rând studiilor efectuate pe aceste specii. În cazul în care va fi necesară realizarea acestor studii la specii de nerozătoare pot fi aplicate, de asemenea, principiile și procedurile descrise, cu modificările corespunzătoare, împreună cu cele descrise în capitolul B.27 „Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6) din prezenta anexă, astfel cum este descris în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (*Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies*) (7).
3. Cele trei căi de administrare principale utilizate în studiile de toxicitate cronică/carcinogenitate sunt cea orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate și de calea de expunere predominantă la om. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).
4. Această metodă de testare vizează expunerea pe cale orală, calea cea mai frecvent utilizată în cadrul studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate. Deși studiile pe termen lung care utilizează expunerea pe cale cutanată sau prin inhalare pot fi, de asemenea, necesare pentru evaluarea riscurilor la adresa sănătății umane și/sau în conformitate cu anumite regimuri de reglementare, ambele căi de expunere presupun o complexitate tehnică deosebită. Aceste studii vor trebui să fie proiectate de la caz la caz și, chiar dacă metoda de testare, astfel cum este prezentată aici, pentru evaluarea toxicității cronice și carcinogenității prin administrare orală ar putea forma baza unui protocol pentru studii privind administrarea pe cale cutanată/prin inhalare în ceea ce privește recomandările privind perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc., sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (7) (8) și pe cale cutanată (7). La proiectarea studiilor pe termen lung privind expunerea prin inhalare ar trebui consultate, în mod special, capitolul B.8 (9) și capitolul B.29 (10) din prezenta anexă, împreună cu Ghidul OCDE privind testarea acută prin inhalare (8). Capitolul B.9 din prezenta anexă (11) ar trebui să fie consultat în cazul testelor efectuate pe cale cutanată.

## ▼ M4

5. Studiul combinat de toxicitate cronică/carcinogenitate oferă informații privind posibilele pericole la adresa sănătății care pot apărea ca urmare a expunerii repetate pe o perioadă cel mult egală cu întreaga durată de viață a speciei utilizate. Studiul furnizează informații privind efectele toxice ale substanței chimice testate, inclusiv eventualul potențial cancerigen, indicând organele țintă și posibilitatea de acumulare. Acesta poate oferi și o estimare a nivelului la care nu se observă efecte adverse în ceea ce privește efectele toxice și, în cazul substanțelor cancerigene non-genotoxice, în ceea ce privește răspunsul tumoral, care poate fi utilă la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii umane. De asemenea, se pune accentul pe necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații cu putință.
6. Obiectivele studiilor de toxicitate cronică/carcinogenitate incluse în această metodă de testare includ:
  - identificarea proprietăților cancerigene ale unei substanțe chimice testate care conduc la o incidență crescută a neoplasmelor, creșterea numărului de neoplasme maligne sau reducerea perioadei de apariție a neoplasmelor comparativ cu grupurile martor;
  - identificarea perioadei de apariție a neoplasmelor;
  - identificarea toxicității cronice a substanței chimice testate;
  - identificarea organului (organelor) țintă ale toxicității cronice și carcinogenității;
  - caracterizarea relației doză-răspuns;
  - identificarea nivelului dozei fără efect advers vizibil (NOAEL) sau a punctului de plecare pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);
  - extrapolarea efectelor cancerigene la niveluri ale expunerii umane corespunzătoare unor doze reduse;
  - predicția efectelor toxicității cronice la niveluri ale expunerii umane;
  - furnizarea de date pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (2) (7) (12) (13) (14) (15).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Atunci când apreciază și evaluează carcinogenitatea și toxicitatea cronică potențiale ale unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare ar trebui să țină cont de toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată anterior efectuării studiului, în vederea adaptării acestuia pentru o testare mai eficientă a proprietăților toxicologice ale substanței și pentru a reduce la minimum utilizarea animalelor. Informațiile și analizarea modului de acțiune al unei substanțe suspectate a fi cancerigenă (2) (7) (12) (13) (14) (15) sunt deosebit de importante, deoarece proiectul optim al studiului poate diferi în funcție de caracterul cancerigen genotoxic cunoscut sau suspectat al substanței chimice testate. Orientări suplimentare privind modul de acțiune sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7).
8. Informațiile care vor ajuta la proiectarea studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, orice date referitoare la modul de acțiune, rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, inclusiv teste de genotoxicitate, utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) și potențialul de expunere umană, datele Q(SAR) disponibile, caracterul mutagen/genotoxic, carcinogenitatea și alte date toxicologice referitoare la substanțele chimice înrudite din punct de vedere structural, datele toxicocinetice disponibile (cinetica dozei unice și, de asemenea, a dozei multiple, atunci când este disponibilă) și datele obținute din alte studii de expunere repetată. Determinarea toxicității cronice/carcinogenității ar trebui efectuată numai după obținerea de informații

## ▼ M4

inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate cu doză repetată de 28 de zile și/sau de 90 de zile. Informații utile pot fi oferite, de asemenea, de testele de scurtă durată de inițiere-promovare a cancerului. Ar trebui avută în vedere o procedură de testare etapizată a carcinogenității ca parte din evaluarea generală a posibilelor efecte adverse ale unei anumite substanțe chimice testate asupra sănătății (16) (17) (18) (19).

9. Înainte de începerea studiului ar trebui stabilite cele mai adecvate metode statistice pentru analiza rezultatelor, în funcție de proiectul experimental și obiectivele date. Între aspectele care ar trebui avute în vedere se află necesitatea ca statisticile să includă ajustarea în funcție de supraviețuire, analiza riscurilor de tumori cumulative în raport cu durata de supraviețuire, analiza perioadei până la apariția tumorii și analiza în cazul sfârșitului prematur al unui sau mai multor grupuri. Ghidul nr. 116 (7) și Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (20) conțin recomandări privind analizele statistice adecvate, precum și referințe cheie la metode statistice acceptate la nivel internațional.
10. În cursul realizării unui studiu de carcinogenitate ar trebui să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile fundamentale conținute în Ghidul OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (21), în special punctul 62. Acest punct prevede: *„În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, conducând la deteriorarea în continuare a stării, trebuie să se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia trebuie să includă considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, trebuie să crească frecvența observărilor, după cum este necesar. De asemenea, fără a afecta negativ scopul testului, se poate întrerupe temporar dozarea sau se poate reduce doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința”*.
11. Orientări detaliate și o discuție asupra principiilor de selectare a dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și carcinogenitate sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7) și în două publicații ale International Life Sciences Institute (22) (23). Strategia de selecție a dozei principale depinde de obiectivul sau obiectivele primare ale studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor dozelor adecvate ar trebui să asigure un echilibru între screening-ul pericolelor, pe de o parte, și caracterizarea reacțiilor la doze reduse și relevanța acestora, pe de altă parte. Acest lucru este necesar în special în cazul studiului combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate de față.
12. Ar trebui avută în vedere efectuarea acestui studiu combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate în locul realizării separate a studiului de toxicitate cronică (capitolul B.30 din prezenta anexă) și a studiului de carcinogenitate (capitolul B.32 din prezenta anexă). Testul combinat asigură o eficiență mai mare din punct de vedere financiar și al duratei și o reducere a numărului de animale comparativ cu realizarea studiilor separate, fără a compromite calitatea datelor obținute în etapa de studiu a cronicității sau a carcinogenității. Cu toate acestea, când se realizează studiul combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate ar trebui să se acorde atenție deosebită principiilor de selecție a dozei (punctele 11 și 22-26), recunoscându-se în același timp că anumite cadre de reglementare pot impune efectuarea separată a unor astfel de studii. Orientări suplimentare pentru obținerea unei eficiențe maxime a studiului combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate în ceea ce privește posibilitățile de reducere a numărului de animale utilizate și simplificarea diferitelor proceduri experimentale sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7).

▼ **M4**

13. Definițiile utilizate în contextul acestei metode de testare sunt disponibile la sfârșitul prezentului capitol și în Ghidul nr. 116 (7).

**PRINCIPIUL TESTULUI**

14. Proiectul studiului prevede două etape paralele: o etapă privind cronicitatea și o etapă privind carcinogenitatea (pentru duratele acestora, a se vedea punctele 34, respectiv 35). Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, dar și administrarea prin inhalare sau pe cale cutanată poate fi adecvată. În etapa privind cronicitatea, substanța chimică testată se administrează zilnic, în doze crescătoare, la mai multe grupuri de animale de test, un nivel al dozei pe grup, fiind administrată în mod normal timp de 12 luni, deși perioadele de administrare pot varia în funcție de cerințele de reglementare (a se vedea punctul 34). Această perioadă ar trebui să fie suficient de lungă pentru a evidenția efectele toxicității cumulative, dar și suficient de scurtă pentru a preveni efectele de confuzie cauzate de modificările legate de îmbătrânire. Proiectul studiului poate include, de asemenea, una sau mai multe sacrificări pe parcurs, de exemplu la 3 și la 6 luni, și pot fi incluse grupuri suplimentare de animale pentru a le înlocui pe cele sacrificate (a se vedea punctul 20). În etapa privind carcinogenitatea, substanța chimică testată este administrată zilnic mai multor grupuri de animale de test, pe o perioadă îndelungată din viața acestora. Animalele sunt observate cu atenție în ambele etape pentru identificarea semnelor de toxicitate și dezvoltarea de leziuni neoplazice. Animalele care au murit sau care au fost sacrificate în cursul testului sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt sacrificate și autopsiate.

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

15. Această metodă de testare se referă în principal la aprecierea și evaluarea toxicității cronice și carcinogenității la rozătoare (punctul 2). Poate fi avută în vedere utilizarea speciilor de nerozătoare atunci când datele disponibile sugerează că acestea oferă date mai relevante pentru anticiparea efectelor asupra sănătății umane. Alegerea speciei ar trebui justificată. Specia de rozătoare preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu, șoarecele. Deși folosirea șoarecilor în testele de carcinogenitate poate avea o utilitate limitată (24) (25) (26), unele programe de reglementare actuale continuă să impună efectuarea testelor de carcinogenitate pe șoareci, cu excepția cazurilor în care este stabilit faptul că un astfel de studiu nu este necesar din punct de vedere științific. Șobolanii și șoarecii au fost preferați ca modele experimentale datorită duratei de viață relativ scurte, utilizării extinse în studii farmacologice și toxicologice, susceptibilității la declanșarea tumorilor și disponibilității de sușe cu un nivel suficient de caracterizare. Ca urmare a acestor caracteristici, există un volum mare de informații disponibile privind fiziologia și patologia acestora. Protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și de carcinogenitate pe specii de nerozătoare ar trebui să se întemeieze, dacă este necesar, pe principiile evidențiate în această metodă de testare și în capitolul B.27 din prezenta anexă, „Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6). Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).
16. Trebuie să se utilizeze animale adulte, tinere, sănătoase provenind din sușe utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Studiul combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate trebuie să se desfășoare pe animale provenite din aceeași sușă și sursă ca animalele utilizate în cadrul studiilor preliminare de toxicitate de scurtă durată; cu toate acestea, în cazul în care animalele din această sușă și sursă sunt recunoscute ca având dificultăți de satisfacere a criteriilor acceptate de supraviețuire necesare pentru studiile de lungă durată [a se vedea Ghidul nr. 116 (7)], ar trebui avută în vedere utilizarea unei sușe de animale cu o rată de supraviețuire acceptabilă pentru studiile pe termen lung. Femelele ar trebui să fie nulipare și să nu fie gestante.

▼ **M4****Condiții de adăpostire și de hrănire**

17. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; adăpostirea individuală ar trebui avută în vedere numai atunci când se justifică din punct de vedere științific (27) (28) (29). Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Temperatura incintei în care se află animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul, nivelul urmărit ar trebui să fie de 50-60 %. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut. Alimentația ar trebui să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei supuse testului, iar conținutul contaminanților din alimentație, inclusiv dar fără a se limita la reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fitoestrogeni, metale grele și micotoxine, care pot influența rezultatul testului, ar trebui menținut la un nivel cât mai redus. Informațiile analitice privind nivelul nutrienților și al substanțelor contaminante din alimentație ar trebui generate periodic, cel puțin la începutul studiului și în caz de modificare a grupului utilizat, și ar trebui incluse în raportul final. În mod similar, ar trebui furnizate informații analitice privind apa de băut utilizată în cursul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a se asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor în cazul în care substanța chimică testată se administrează prin alimentație.

**Pregătirea animalelor**

18. Ar trebui utilizate animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și care nu au fost supuse anterior altor proceduri experimentale. În cazul rozătoarelor, administrarea ar trebui să înceapă cât mai curând posibil după înțarcare și aclimatizare, preferabil, înainte de a împlini vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui precizată specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele utilizate în scopuri experimentale de ambele sexe ar trebui să fie minime și să nu depășească  $\pm$  20 % din greutatea medie a tuturor animalelor din cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele ar trebui să fie repartizate aleator în grupuri tratate și grupuri martor. După această repartizare aleatorie, greutatea medie a grupurilor de același sex nu mai ar trebui să prezinte diferențe semnificative. Dacă există diferențe importante din punct de vedere statistic, etapa de repartizare aleatorie ar trebui repetată, dacă este posibil. Fiecărui animal ar trebui să i se atribuie un număr unic de identificare, și care să îi fie marcat permanent prin tatuare, implantarea unui microcip sau prin altă metodă adecvată.

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

19. Ar trebui utilizate animale de ambele sexe. Ar trebui utilizat un număr suficient de animale pentru a permite o evaluare biologică și statistică amănunțită. Astfel, fiecare grup de rozătoare de doză (conform punctului 22) și grupul martor aferent din etapa de studiu al carcinogenității ar trebui să conțină cel puțin 50 de animale de fiecare sex. În funcție de scopul studiului, puterea statistică a estimărilor principale poate fi majorată prin alocarea diferențiată și neproportională a animalelor în diferitele grupuri de doză, cu mai mult de 50 de animale repartizate în grupurile cu tratate cu doză redusă, de exemplu, pentru a estima potențialul cancerigen la doze reduse. Cu toate acestea, ar trebui recunoscut faptul că o creștere moderată a dimensiunii grupului va oferi o creștere relativ redusă a puterii statistice a studiului. Atunci când sunt utilizate rozătoare, fiecare grup de doză (conform punctului 22) și grupul martor aferent din etapa de studiu al carcinogenității ar trebui să conțină cel puțin 10 animale de fiecare sex. Ar trebui observat că acest număr este mai mic decât cel utilizat în studiul



▼ **M4**

privind toxicitatea cronică (capitolul B.30 din prezenta anexă). Totuși, interpretarea datelor provenite de la un număr mai mic de animale pe grup care au fost obținute în etapa de toxicitate cronică a acestui studiu combinat va fi confirmată de datele provenite de la numărul mai mare de animale, obținute în etapa de carcinogenitate a studiului. În studiile care utilizează șoareci, efectuarea tuturor analizelor hematologice poate necesita un număr suplimentar de animale în fiecare grup de doză în etapa de toxicitate cronică. Informații suplimentare privind proiectul statistic al studiului și selectarea nivelurilor dozelor în vederea maximizării puterii statistice sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).

#### **Sacrificări pe parcurs, grupuri satelit și animale santinelă**

20. Studiul poate conține prevederi referitoare la sacrificări pe parcurs, de exemplu la 6 luni în etapa de studiu a toxicității cronice, care să ofere informații privind progresul modificărilor non-neoplazice și informații mecaniciste, dacă acestea sunt justificate din punct de vedere științific. Sacrificările pe parcurs pot să nu fie justificate din punct de vedere științific atunci când studiile de toxicitate cu dozare repetată asupra substanței chimice testate conțin deja astfel de informații. Animalele utilizate în etapa de toxicitate cronică a acestuia, de obicei pentru o perioadă de 12 luni (punctul 34), oferă date utile privind sacrificările pe parcurs pentru etapa de carcinogenitate a studiului, permițând astfel reducerea numărului total de animale utilizate. În etapa de toxicitate cronică a studiului pot fi incluse, de asemenea, grupuri satelit pentru monitorizarea reversibilității oricăror modificări toxicologice induse de substanța chimică testată. Acestea pot fi limitate la nivelul cel mai mare al dozei și la grupul martor. Dacă este necesar, în studiu poate fi inclus un grup suplimentar de animale santinelă (de obicei, câte 5 animale de fiecare sex), în scopul monitorizării stadiului bolii (30). Orientări suplimentare privind introducerea în proiectul studiului a sacrificărilor pe parcurs, a animalelor satelit și santinelă, precum și pentru diminuarea numărului de animale utilizate sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).
  
21. Dacă în proiectul studiului sunt incluse animale satelit și/sau sacrificări pe parcurs, numărul animalelor din fiecare grup de doză inclus în acest scop va fi, în mod normal, de câte 10 exemplare pentru fiecare sex, iar numărul total de animale incluse în proiectul studiului ar trebui să fie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de finalizarea studiului. Animalele sacrificate pe parcurs și animalele satelit ar trebui supuse, în mod normal, aceluiași observații și investigații patologice ca și animalele utilizate în etapa privind toxicitatea cronică a studiului principal, inclusiv măsurători ale greutății corporale, consum de hrană/apă, hematologice și de biochimie clinică, deși pot fi prevăzute și dispoziții (în cazul grupurilor care urmează a fi sacrificate în cursul studiului) pentru limitarea măsurătorilor la criterii cheie specifice, precum neurotoxicitatea sau imunitoxicitatea.

#### **Grupuri de doză și dozare**

22. Orientări privind toate aspectele legate de selectarea și intervalul între doze sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7). Ar trebui utilizate cel puțin trei doze diferite și un grup martor paralel, atât în etapa de toxicitate cronică, cât și în cea de carcinogenitate. Nivelurile dozelor se vor stabili, în general, în funcție de rezultatele studiilor pe termen scurt cu doză repetată sau ale studiilor de stabilire a dozei și ar trebui să ia în considerare orice date toxicologice și toxicocinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțele chimice înrudite.

## ▼ M4

23. Este posibil ca un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite să nu fie considerat necesar în etapa de toxicitate cronică a studiului dacă se poate anticipa că un test cu o doză având un singur nivel, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, nu va produce efecte adverse. Această decizie ar trebui să se întemeieze pe informații obținute din studii preliminare și, ținând cont de datele de la substanțele chimice înrudite structural, pe absența probabilă a toxicității. Limita recomandată este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu excepția cazurilor în care expunerea umană indică necesitatea utilizării unui nivel mai mare al dozei.
24. Cu excepția cazului în care există limite impuse de caracterul fizico-chimic sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, nivelul cel mai mare al dozei ar trebui ales astfel încât să permită identificarea principalelor organe-țintă și a efectelor toxice, evitând în același timp suferința, toxicitatea severă, morbiditatea sau moartea. În mod normal, nivelul cel mai mare al dozei ar trebui selectat astfel încât să provoace toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %). Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), o doză maximă mai mică decât doza care provoacă toxicitate poate fi selectată dacă, de exemplu, o doză provoacă un efect advers îngrijorător, dar care are un impact redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale.
25. Nivelurile dozelor și intervalele între doze pot fi selectate astfel încât să se determine o relație doză-răspuns și, în funcție de modul de acțiune al substanței chimice testate, un NOAEL sau un alt rezultat avut în vedere pentru studiu, de exemplu BMD (doză de referință) (a se vedea punctul 27). Factorii care ar trebui luați în considerare la stabilirea dozelor reduse includ panta preconizată a curbei doză-răspuns, dozele la care pot avea loc modificări importante ale metabolismului sau modului de acțiune toxică și dacă se anticipează un prag sau un punct de pornire pentru extrapolarea dozei reduse. Principalul obiectiv al unui studiu combinat de carcinogenitate/toxicitate cronică va consta în obținerea de informații utilizabile în scopuri de evaluare a riscului de carcinogenitate, iar informațiile privind toxicitatea cronică vor fi, în mod normal, un obiectiv secundar. Acest aspect ar trebui avut în vedere atunci când se stabilesc nivelurile dozelor și intervalele între doze pentru studiu.
26. Intervalul selectat între doze va depinde de obiectivele studiului și de caracteristicile substanței chimice testate și nu poate fi stabilit în detaliu în această metodă de testare, dar intervale ce corespund unui factor de 2 până la 4 oferă în mod frecvent performanțe de testare bune în determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor și este deseori de preferat să fie adăugat un al patrulea grup de testare în loc să fie utilizate intervale foarte mari între doze (de exemplu, mai mari decât un factor cuprins între 6-10). În general, un factor mai mare de 10 ar trebui evitat, iar acesta ar trebui justificat în cazul în care este utilizat.
27. Astfel cum este evidențiat în Ghidul nr. 116 (7), elementele de care ar trebui să se țină cont la selectarea dozei includ:
- non-linearități sau puncte de inflexiune cunoscute sau suspectate în relația doză-răspuns;
  - toxicocinetică și intervale între doze la care apare sau nu apare fenomenul de inducție metabolică, saturație sau nelinearitate între dozele externe și interne;
  - leziuni precursor, markeri de efect sau indicatori ai desfășurării unor procese biologice subiacente cheie;

## ▼ M4

- aspecte cheie (sau suspectate) ale modului de acțiune, precum doze la care începe să se manifeste citotoxicitate, nivelurile hormonilor sunt perturbate, mecanismele homeostatice devin inefficiente etc.;
  - regiuni ale curbei doză-răspuns în care sunt necesare estimări deosebit de robuste, de exemplu, în intervalul dozei de referință anticipate sau un prag suspectat;
  - considerarea nivelurilor anticipate de expunere umană, în special la selectarea dozelor medii și reduse.
28. Grupul martor va fi un grup netratat sau un grup martor pentru vehicul în cazul în care pentru administrarea substanței chimice testate este utilizat un vehicul. Exceptând administrarea substanței chimice testate, animalele din grupul martor ar trebui tratate în mod identic cu cele din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum utilizat de vehicul dintre grupurile de doză. Dacă o substanță chimică testată se administrează în alimente și provoacă reducerea semnificativă a apetitului ca urmare a modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor, poate fi considerată necesară utilizarea, ca punct de referință mai adecvat, a unui grup martor hrănit în paralel.

**Prepararea dozelor și administrarea substanței chimice testate**

29. Substanța chimică testată se administrează de obicei pe cale orală, prin alimente sau apa de băut sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7). Calea și metoda de administrare depind de scopul studiului, de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de biodisponibilitatea acestora și de calea și metoda de expunere predominantă la om. Alegerea căii și metodei de administrare ar trebui să fie justificată. În interesul bunăstării animalelor, gavajul oral ar trebui folosit, în mod normal, numai în cazul agenților pentru care această cale și această metodă de administrare corespunde unei căi de expunere potențiale rezonabile la om (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțele chimice alimentare și ambientale, inclusiv a pesticidelor, administrarea are loc de obicei prin hrană sau apa de băut. Totuși, în anumite situații, cum ar fi riscul de expunere profesională, administrarea pe alte căi poate fi mai potrivită.
30. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă într-un vehicul adecvat. Ar trebui luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței chimice testate, efectele asupra proprietăților chimice ale substanței chimice testate care i-ar putea afecta caracteristicile toxice, precum și efectele asupra consumului de alimente sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalelor. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior a unei soluții posibile în alte vehicule. Dacă vehiculul este altul decât apa, ar trebui să fie cunoscute proprietățile toxice ale vehiculului. Ar trebui să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței chimice testate și a omogenității soluțiilor de dozare sau a alimentației (după caz) în condițiile de administrare (de exemplu, alimentație).
31. Pentru substanțele chimice administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță chimică testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. În studiile de toxicitate pe termen lung care utilizează administrarea prin alimentație, concentrația substanței chimice testate din hrană nu ar trebui să depășească, în mod normal, o limită superioară de 5 % din alimentația totală, pentru a fi evitate dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată se administrează în hrană, se poate folosi fie o concentrație alimentară constantă (mg/kg hrană sau ppm), fie o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor (mg/kg greutate corporală), care se calculează săptămânal. Alternativa utilizată ar trebui precizată.

## ▼ M4

32. În cazul administrării orale, animalele sunt expuse la o doză zilnică din substanța chimică testată (șapte zile pe săptămână) timp de 12 luni (etapa de toxicitate cronică) sau 24 de luni (etapa de carcinogenitate), a se vedea, de asemenea, punctele 33 și 34. Orice alt regim de dozare, cum ar fi cel de cinci zile/săptămână, ar trebui să fie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt, în mod normal, tratate cu substanța chimică testată timp de cel puțin 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, astfel cum se indică în capitolul B.9 din prezenta anexă (11), timp de 12 luni (etapa de toxicitate cronică) sau 24 de luni (etapa de carcinogenitate). Expunerea prin inhalare se desfășoară timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar dacă se justifică poate fi utilizată și o perioadă de expunere de 5 zile pe săptămână. Perioada de expunere variază de obicei între 12 luni (etapa de toxicitate cronică) și 24 de luni (etapa de carcinogenitate). Dacă speciile de rozătoare, altele decât șobolanii, sunt expuse numai în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi modificate pentru a reduce la minimum nivelurile de suferință specifice speciei. Orice durată de expunere mai mică de 6 ore pe zi ar trebui să fie justificată. A se vedea, de asemenea, capitolul B.8 din prezenta anexă (9).
33. Când substanța chimică testată se administrează animalelor prin gavaj, ar trebui să se folosească o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la aceleași ore în fiecare zi. În mod normal, o doză unică se administrează o dată pe zi, iar în cazurile în care, de exemplu, substanța chimică testată are efect iritant local, aceeași cantitate de doză zilnică poate fi administrată fracționat (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de greutatea animalului utilizat în scopuri experimentale. Volumul ar trebui menținut la un nivel cât mai redus posibil și nu ar trebui să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală la rozătoare (31). Se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin modificarea concentrațiilor, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele chimice potențial corozive sau iritante sunt exceptate de la această regulă și ar trebui să fie diluate pentru a evita efecte locale severe. Testele la concentrații care pot fi corozive sau iritante pentru tractul gastrointestinal ar trebui evitate.

**Durata studiului**

34. Perioada de administrare și durata etapei de toxicitate cronică tipice ale acestui studiu sunt de 12 luni, dar proiectul studiului permite și poate fi aplicat pentru studii cu durata mai scurtă (de exemplu, 6 sau 9 luni) sau mai lungă (de exemplu, 18 sau 24 de luni), în funcție de cerințele de reglementare sau în scopuri specifice de ordin mecanicist. Abaterile de la o perioadă de expunere de 12 luni ar trebui să fie justificate, în special atunci când aceasta este mai scurtă. Toate grupurile de doze alocate acestei etape vor fi oprite la momentul stabilit pentru evaluarea toxicității cronice și a patologiei non-neoplazice. Grupurile satelit utilizate pentru monitorizarea reversibilității oricăror modificări toxicologice induse de substanța chimică testată ar trebui menținute fără administrarea niciunei doze timp de cel puțin 4 săptămâni și cel mult o treime din durata totală a studiului după încetarea expunerii.
35. Durata tipică a etapei de evaluare a carcinogenității din acest studiu va fi de 24 de luni pentru rozătoare, reprezentând durata de viață normală pentru majoritatea animalelor utilizate. Pot fi utilizate durate mai scurte sau mai lungi ale studiului în funcție de durata de viață a sușei speciei de animale utilizate în cadrul studiului, dar acestea ar trebui să fie justificate. În cazul anumitor sușe de șoareci, de exemplu, AKR/J, C3H/J sau C57BL/6J, perioada de 18 luni poate fi mai adecvată. În cele ce urmează sunt prezentate câteva orientări privind durata, încetarea studiului și supraviețuirea; orientări suplimentare, inclusiv considerarea acceptabilității unui studiu de carcinogenitate negativ în legătură cu supraviețuirea în cadrul studiului, sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7):

## ▼M4

- încheierea studiului ar trebui avută în vedere atunci când numărul de animale supraviețuitoare din grupurile cu doză redusă sau din grupul martor scade sub 25 %;
- în cazul în care numai animalele din grupul tratat cu doza maximă mor prematur datorită toxicității, aceasta nu ar trebui să determine încheierea studiului;
- animalele supraviețuitoare ar trebui considerate separat, în funcție de sex;
- studiul nu ar trebui să fie extins dincolo de limita la care datele obținute nu mai sunt suficiente pentru a permite efectuarea unei evaluări valabile din punct de vedere statistic.

## OBSERVAȚII (ETAPA DE TOXICITATE CRONICĂ)

36. Toate animalele ar trebui examinate pentru observarea semnelor de morbiditate și mortalitate de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv la sfârșit de săptămână și în zilele nelucrătoare. În cazul administrării prin gavaj, se recomandă ca examinările clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare.
37. Toate animalele ar trebui să fie supuse unor observații clinice detaliate cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a permite realizarea de comparații la același individ), la sfârșitul primei săptămâni de studiu și apoi lunar. Protocolul de observație ar trebui să fie proiectat astfel încât variațiile între observatorii individuali să fie reduse la minimum și independente de grupul testat. Aceste observații se recomandă să fie făcute în afara cuștii în care sunt ținute animalele, de preferință într-o încălț standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele ar trebui înregistrate cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Ar trebui acționat pentru a se asigura că variațiile condițiilor de observare sunt minime. Observațiile ar trebui să includă, dar nu sunt limitate la modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, secrețiilor și excrețiilor și reacțiile neurovegetative (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilei, respirație neobișnuită). Se vor consemna, de asemenea, toate modificările de comportament, modificările posturii sau ale reacțiilor la manipulare, precum și apariția unor mișcări clonice sau tonice, a unor comportamente stereotipe (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate), precum și orice alt comportament bizar (automutilare, mers cu spatele) (32).
38. Toate animalele ar trebui supuse unui examen oftalmologic, cu un oftalmoscop sau un alt aparat adecvat, înainte de prima administrare a substanței chimice testate. La încheierea studiului, acest examen ar trebui să fie efectuat la toate animalele, însă cel puțin la animalele din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor. Dacă se constată modificări ale ochilor asociate tratamentului, ar trebui examinate toate animalele. În cazul în care analiza structurală sau alte informații sugerează toxicitate oculară, frecvența examenelor oculare ar trebui mărită.
39. În cazul substanțelor chimice ale căror teste anterioare de toxicitate cu doză repetată la 28 și/sau 90 de zile au indicat un potențial de inducere a efectelor neurotoxice și reacții la diferiți stimuli senzoriali (32) (auditivi, vizuali și proprioceptivi) (33) (34) (35), forța de prehensiune (36) și activitatea motorie (37) pot fi evaluate opțional înainte de începerea studiului și la perioade de 3 luni după aceasta, timp de cel mult 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă acesta durează mai mult de 12 luni). Detalii suplimentare referitoare la metodele utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Totuși, ar putea fi folosite și metode diferite de cele menționate.

## ▼ M4

40. În cazul substanțelor chimice ale căror teste anterioare de toxicitate cu doză repetată la 28 și/sau 90 de zile au indicat un potențial de inducere a efectelor imunotoxice, investigații suplimentare ale acestui efect pot fi realizate opțional la încheierea studiului.

*Greutatea corporală, consumul de hrană/apă și eficiența hranei*

41. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul tratamentului și cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de hrană și eficiența alimentelor ar trebui măsurate cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, apoi cel puțin o dată pe lună. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa de băut, consumul de apă ar trebui măsurat cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Măsurarea consumului de apă ar trebui avută în vedere, de asemenea, în cadrul studiilor în care băutul apei suferă modificări.

*Hematologie și biochimie clinică*

42. În studiile la rozătoare, examinările hematologice ar trebui să fie realizate la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), la intervale de 3, 6 și 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă acesta durează mai mult de 12 luni). În studiile la șoareci, efectuarea tuturor analizelor hematologice impune poate necesita utilizarea de animale satelit (a se vedea punctul 19). În studiile la specii de nerozătoare, se vor recolta probe de la un număr mai mic de animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și din același grup în cazul studiilor la câini), la intervale de prelevare intermediare și la încheierea studiului, în aceleași condiții descrise pentru rozătoare. Măsurătorile la intervale de trei luni la rozătoare sau la nerozătoare nu ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte asupra parametrilor hematologici. Probele de sânge ar trebui recoltate sub anestezie, din anumite locuri (de exemplu, prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital).
43. Ar trebui investigați următorii parametri (38): numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de hematii, numărul de trombocite, concentrația hemoglobinei, hematocritul (volumul celular sangvin după centrifugare), media volumului globulelor (MCV), media globulară a hemoglobinei (MCH), concentrația medie a hemoglobinei (MCHC), timpul de protrombină și timpul de tromboplastină parțial activată. Alți parametri hematologici, cum sunt corpurile Heinz, morfologia atipică a hematiilor sau methemoglobina, pot fi măsurați, după caz, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În general, ar trebui adoptată o abordare flexibilă, în funcție de efectul observat și/sau scontat al substanței chimice testate în cauză. Dacă substanța chimică testată are un efect asupra sistemului hematopoietic, pot fi indicate, de asemenea, numărul de reticulocite și citologia măduvei osoase, chiar dacă aceste valori nu ar trebui măsurate în mod obișnuit.
44. Ar trebui efectuate analize de biochimie clinică în vederea investigării principalelor efecte toxice asupra țesuturilor și, în special, asupra ficatului și a rinichilor, pe probe de sânge prelevate de la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), la aceleași intervale de timp specificate pentru investigațiile hematologice. În studiile la șoareci, efectuarea tuturor analizelor de biochimie clinică impune poate necesita utilizarea de animale satelit. În studiile la specii de nerozătoare, se vor recolta probe de la un număr mai mic de animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și din același grup în cazul studiilor pe câini), la intervale de prelevare intermediare și la încheierea studiului, în aceleași condiții descrise pentru rozătoare. Măsurătorile la intervale de trei luni la rozătoare și la nerozătoare nu

▼ **M4**

ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte asupra parametrilor de biochimie clinică. Se recomandă ca animalele să nu fie hrănite cu o noapte înainte de prelevarea probelor de sânge (cu excepția șoarecilor)<sup>(1)</sup>. Ar trebui investigați următorii parametri (38): glucoză, uree (azot ureic), creatinină, proteine totale, albumină, calciu, sodiu, potasiu, colesterol total, cel puțin două teste adecvate pentru evaluare hepatocelulară (alanin-aminotransferază, aspartat-aminotransferază, glutamat-dehidrogenază, acizi biliari totali) (39) și cel puțin două teste adecvate de evaluare hepatobiliară (fosfatază alcalină, gama-glutamyl transferază, 5'-nucleotidază, bilirubină totală, acizi biliari totali) (39). După caz, pot fi măsurați alți parametri de chimie clinică cum sunt trigliceridele à jeun, hormonii specifici și colinesteraza, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În general, este nevoie de o abordare flexibilă, adaptată efectului observat și/sau scontat al substanței chimice testate în cauză.

45. Ar trebui efectuate analize de urină la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), pe probe recoltate la aceleași intervale ca pentru analizele de hematologie și chimie clinică. Măsurătorile la intervale de trei luni nu ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte în urma analizelor de urină. Următoarea listă de parametri a fost inclusă într-o recomandare a experților privind studiile de patologie clinică (38): aspectul, volumul, osmolalitatea sau greutatea specifică, pH-ul, proteinuria totală și glicozuria. Alte analize vizează corpii cetoni, urobilinogenul, bilirubina și hemoragiile oculte. Dacă este necesar, pot fi utilizați și alți parametri pentru extinderea investigării efectului (efectelor) observat(e).
46. În general, se consideră că variabilele de referință hematologice și de biochimie clinică ar trebui să fie stabilite înainte de tratament în cazul studiilor la câini, dar nu și în cazul studiilor la rozătoare (38). Totuși, dacă datele de referință istorice (a se vedea punctul 58) nu sunt adecvate, poate fi luată în considerare generarea unor astfel de date.

**PATOLOGIE***Autopsia*

47. În mod normal, toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care include examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor și a cavităților craniană, toracică și abdominală și a conținutului acestora. Cu toate acestea, pot fi stabilite prevederi care pot limita măsurătorile (în cazul grupurilor care urmează a fi sacrificate pe parcurs sau al grupurilor satelit) la măsurători cheie specifice, cum sunt neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea (a se vedea punctul 21). Aceste animale nu ar trebui să fie supuse unei autopsii și procedurilor ulterioare descrise în punctele următoare. Animalele santinelă pot fi autopsiate de la caz la caz, la alegerea conducătorului studiului.

<sup>(1)</sup> Pentru mai multe analize de ser și plasmă, în special pentru glucoză, este de preferat absența hranei în timpul nopții. Motivul principal este că variația crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efectele mai subtile și ar face dificilă interpretarea. Totuși, ar trebui reținut faptul că lipsa hranei pe durata nopții poate să interfereze cu metabolismul general al animalelor și riscă, în special în studiile în care substanța testată este administrată în alimente, să perturbe expunerea zilnică la această substanță. Toate animalele ar trebui să se afle în aceeași stare fiziologică în momentul evaluării și, prin urmare, se recomandă ca evaluările detaliate sau cele neurologice să aibă loc în alte zile decât cele în care au loc prelevările de probe pentru biochimie clinică.



## ▼ M4

48. Se înregistrează greutatea organelor de la toate animalele, cu excepția celor prevăzute în ultima parte a punctului 47. Glandele suprarenale, creierul, epididimurile, inima, rinichii, ficatul, ovarele, splina, testiculele, glanda tiroidă (cântărită după fixare, împreună cu glandele paratiroide) și uterul de la toate animalele (cu excepția celor găsite muribunde și/sau a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.
49. Țesuturile următoare ar trebui să fie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic ulterior (40) (țesuturile între paranteze pătrate sunt opționale):

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| toate leziunile macroscopice   | inimă  | pancreas  | stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)                      |
| glanda suprarenală   | ileon  | glanda paratiroidă  | [dinți]   |
| aortă  | jejun  | nervi periferici  | testicule   |
| creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte) | rinichi  | glanda pituitară  | timus   |
| cecum  | glanda lacrimală (extraorbitală)   | prostată  | glanda tiroidă  |
| cervix   | ficat  | rect  | [limbă]   |
| glanda coagulantă  | plămân   | glanda salivară   | trahee  |
| colon  | ganglioni limfatici (superficiali și profunzi)                                       | vezicula seminală   | vezica urinară  |
| duoden   | glanda mamară (obligatoriu pentru femele, iar dacă poate fi disecată, și la masculi) | mușchi scheletici   | uter (inclusiv cervix)  |
| epididim   | [căile respiratorii superioare, inclusiv nas, fose nazale și sinusurile paranazale]  | piele   | [ureter]  |
| ochi (inclusiv retina)   | esofag   | măduva spinării (din trei segmente: cervical, mediotoracic și lombar) | [uretra]  |
| [femur, inclusiv articulația]  | [bulbul olfactiv]  | splina  | vaginul   |
| vezica biliară (la specii altele decât șobolanul)                            | ovar   | [stern]   | probă de măduvă osoasă și/sau o puncție aspirativă de măduvă osoasă |
| glanda Harder  |  |   |   |



▼ **M4**

În cazul organelor pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui conservate ambele organe. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea orală și este necesară prelevarea și conservarea specifică a pielii de la locul aplicării. În studiile cu administrare prin inhalare, lista țesuturilor conservate și examinate din căile respiratorii ar trebui să urmeze recomandările conținute în capitolele B.8 (9) și B.29 (10) din prezenta anexă. În cazul altor organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specifice prelevate din tractul respirator), ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală.

*Examenul histopatologic*

50. Sunt disponibile orientări privind bunele practici de realizare a studiilor de patologie toxicologică (40). Ar trebui să fie examinate cel puțin următoarele țesuturi:

- toate țesuturile animalelor din grupurile expuse la doza maximă și din grupurile martor;
- toate țesuturile animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe parcurs;
- toate țesuturile care prezintă anomalii macroscopice, inclusiv tumorile;
- atunci când la grupul expus la doza maximă sunt observate țesuturi-țintă sau țesuturi care prezintă modificări histopatologice în legătură cu tratamentul, se vor examina aceleași țesuturi la toate animalele din toate celelalte grupuri de doză;
- în cazul organelor-pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui examinate ambele organe.

**OBSERVAȚII (ETAPA DE CARCINOGENITATE)**

51. Toate animalele ar trebui examinate pentru observarea semnelor de morbiditate și mortalitate de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv la sfârșit de săptămână și în zilele nelucrătoare. În plus, animalele ar trebui examinate o dată pe zi pentru semne specifice cu relevanță toxicologică. În cazul studiilor cu administrare prin gavaj, animalele ar trebui să fie examinate în perioada imediat următoare administrării dozei. Ar trebui acordată o atenție specială dezvoltării tumorale și ar trebui înregistrate momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea tumorilor atât a celor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile.
52. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul tratamentului și cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de hrană și eficiența alimentelor ar trebui măsurate cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, apoi cel puțin o dată pe lună. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa de băut, consumul de apă ar trebui măsurat cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de apă poate fi măsurat și în cadrul studiilor în care băutul apei suferă modificări.

## ▼ M4

*Hematologie, biochimie chimică și alte măsurători*

53. Pentru a crește volumul de informații obținut din studiu, în special în ceea ce privește modul de acțiune, pot fi prelevate probe de sânge pentru examene hematologice și de biochimie clinică, însă decizia privind aceste prelevări aparține conducătorului studiului. De asemenea, pot fi adecvate analize ale urinei. Datele privind animalele utilizate în etapa de toxicitate cronică a studiului, a cărei durată tipică este de 12 luni (punctul 34), vor oferi informații referitoare la acești parametri. Orientări suplimentare privind utilitatea prelevării acestor probe în cadrul studiului de carcinogenitate sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7). Dacă se prelevează probe de sânge, acestea ar trebui colectate la încheierea perioadei de testare, imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri. Probele de sânge ar trebui recoltate sub anestezie, dintr-un loc stabilit (de exemplu, prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital). De asemenea, pot fi preparate frotiuri sangvine pentru a fi examinate, în special atunci când organul țintă pare a fi măduva osoasă, deși valoarea examinării frotiurilor sangvine în etapa de carcinogenitate a studiului pentru evaluarea potențialului cancerigen/oncogen a fost pusă sub semnul întrebării (38).

## PATOLOGIE

*Autopsia*

54. Toate animalele care participă la studiu, cu excepția animalelor santinelă și a altor animale satelit (a se vedea punctul 20), sunt supuse unei autopsii macroscopice complete și detaliate, care include examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor și a cavităților craniană, toracică și abdominală și a conținutului acestora. Animalele santinelă și animalele satelit pot fi autopsiate de la caz la caz, la alegerea conducătorului studiului. Cântărirea organelor nu este inclusă de obicei în studiul de carcinogenitate, deoarece modificările asociate îmbătrânirii și, ulterior, dezvoltarea tumorilor reduc utilitatea datelor privind greutatea organelor. Totuși, acestea pot fi importante în evaluările în funcție de greutatea probelor și, în special, ale modului de acțiune. Dacă fac parte dintr-un studiu satelit, aceste date ar trebui colectate în termen de cel mult un an de la începerea studiului.
55. Țesuturile următoare ar trebui conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic ulterior (40) (țesuturile între paranteze pătrate sunt opționale):

|  |  |                    |  |
|--|--|--------------------|--|
| toate leziunile macroscopice   | inimă  | pancreas           | stomac (stomacul anterior, stomacul glandular) |
| glanda suprarenală   | ileon  | glanda paratiroidă | [dinți]  |
| aortă  | jejun  | nervi periferici   | testicule                                      |
| creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebelul și bulb rahidian/punte) | rinichi  | glanda pituitară   | timus  |
| cec  | glanda lacrimală (extraorbitală)               | prostată           | glanda tiroidă                                 |
| cervix   | ficat  | rect               | [limbă]  |
| glanda coagulantă  | plămân   | glanda salivară    | trahee   |
| colon  | ganglioni limfatici (superficiali și profunzi) | vezicula seminală  | vezica urinară                                 |

## ▼ M4

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| duoden  | glanda mamară (obligatoriu pentru femele, iar dacă poate fi disecată, și la masculi) | mușchi scheletici  | uter (inclusiv cervix)  |
| epididim  | [căile respiratorii superioare, inclusiv nas, fose nazale și sinusurile paranasale]  | piele  | [ureter]  |
| ochi (inclusiv retina)                            | esofag   | măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar) | [uretra]  |
| [femur, inclusiv articulația]                     | [bulb olfactiv]  | splina   | vaginul   |
| vezica biliară (la specii altele decât șobolanul) | ovar   | [stern]  | probă de măduvă osoasă și/sau o puncție aspirativă de măduvă osoasă |
| glanda Harder                                     |  |  |   |

În cazul organelor pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui conservate ambele organe. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală ar trebui examinată și în cazul studiilor cu administrare cutanată și este necesară prelevarea și conservarea specifică a pielii de la locul aplicării. În studiile cu administrare prin inhalare, lista țesuturilor din căile respiratorii care au fost conservate și examinate ar trebui să urmeze recomandările conținute în capitolele B.8 (8) și B.29 din prezenta anexă (9). În cazul altor organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specifice prelevate din căile respiratorii), ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală.

#### Examenul histopatologic

56. Sunt disponibile orientări privind bunele practici de realizare a studiilor de patologie toxicologică (40). Ar trebui să fie examinate cel puțin următoarele țesuturi:

- toate țesuturile animalelor din grupurile expuse la doza maximă și din grupurile martor;
- toate țesuturile animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe durata studiului;
- toate țesuturile care prezintă anomalii macroscopice, inclusiv tumorile;
- atunci când la grupul expus la doza maximă sunt observate modificări histopatologice apărute ca urmare a tratamentului, se vor examina aceleași țesuturi la toate animalele din toate celelalte grupuri de doză;
- în cazul organelor-pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui examinate ambele organe.

▼ **M4****DATE ȘI RAPORT (CARCINOGENITATE ȘI TOXICITATE CRONICĂ)****Date**

57. Ar trebui furnizate date obținute de la fiecare animal, pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele ar trebui rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup utilizat în scopuri experimentale indicându-se numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau eutanasiate din motive umane și momentul morții sau al eutanasierii acestora, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul apariției acestora, durata și severitatea oricăror efecte toxice, numărul animalelor care au prezentat leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor care au prezentat fiecare tip de leziune. Ar trebui ca mediile și deviațiile standard (pentru datele de test colectate continuu) ale animalelor care prezintă efecte toxice sau leziuni, suplimentar față de clasificarea leziunilor, să fie indicate în tabele rezumative.
58. Datele istorice de control pot fi utile în interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu, în cazul în care există indicii potrivit cărora datele furnizate de grupurile martor paralele diferă substanțial față de datele recente provenite de la animale martor din același laborator de test/colonie. Dacă sunt evaluate, datele istorice de control ar trebui să fie transmise de la același laborator, să se refere la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă și să fi fost obținute într-o perioadă de cel mult cinci ani înainte de studiul în cauză.
59. Dacă este posibil, rezultatele numerice ar trebui evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate ar trebui să fie selecționate în timpul proiectării studiului (punctul 9). Dacă este necesar, procesul de selecție ar trebui să prevadă ajustări privind animalele supraviețuitoare.
60. Raportul de testare ar trebui să conțină următoarele informații:

*Substanța chimică testată:*

- natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare;
- sursa substanței chimice;
- numărul lotului;
- certificatul de analiză chimică.

*Vehiculul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului (dacă acesta este altul decât apa).

*Animalele utilizate în scopuri experimentale:*

- speciile/sușa utilizată și justificarea opțiunii;
- numărul, sexul și vârsta animalelor la începutul testului;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

**▼ M4***Condițiile de testare:*

- justificarea căii de administrare și a dozei alese;
- metodele statistice utilizate pentru analiza datelor, dacă este cazul;
- detalii privind formula substanței chimice testate/prepararea hranei;
- date analitice privind concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- calea de administrare și detalii privind administrarea substanței chimice testate;
- în cazul studiilor prin inhalare se specifică dacă este expus întregul corp sau numai nasul;
- dozele efective (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a concentrației substanței chimice testate din hrană sau apa de băut (mg/kg sau ppm) în doza efectivă, dacă este cazul;
- detalii cu privire la calitatea hranei și a apei.

*Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele):**Date generale:*

- date privind supraviețuirea;
- greutatea corporală/modificările greutății corporale;
- consumul de hrană, calculul eficiența hranei (dacă a fost efectuat) și consumul de apă, după caz;
- date toxicocinetice, dacă sunt disponibile;
- date ale examenului oftalmoscopic (dacă sunt disponibile);
- date hematologice (dacă sunt disponibile);
- date de chimie clinică (dacă sunt disponibile).

*Concluziile clinice:*

- semne de toxicitate;
- incidența (și severitatea, dacă a fost evaluată) oricărei anomalii;
- natura, severitatea și durata observațiilor clinice (temporare sau permanente).

*Datele privind autopsia:*

- greutatea corporală la finalul studiului;
- greutatea organelor și raportul dintre acestea și greutatea corporală, după caz;
- rezultatele autopsiei; incidența și gravitatea anomaliilor.

*Examenul histopatologic:*

- rezultate histopatologice non-neoplazice;
- rezultate histopatologice neoplazice;

**▼M4**

- corelația între observațiile macroscopice și microscopice;
- descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice care au legătură cu tratamentul, inclusiv clasificarea severității;
- orice raport de evaluare științifică a lamelelor.

*Interpretarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.*

*Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:*

- discutarea metodelor de modelare;
- relațiile doză-răspuns;
- datele istorice de control;
- analiza oricăror informații privind modul de acțiune;
- determinarea BMD, NOAEL sau LOAEL;
- relevanța pentru om.

*Concluzii.*

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (6) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Test de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.
- (7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, disponibil pe site-ul internet public al OCDE referitor la orientările privind testele, la adresa [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 de zile”.
- (10) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.
- (11) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.

## ▼ M4

- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, *Crit. Rev. in Toxicol.* 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (ed.), ILSI Press, Washington, D.C.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds.), *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.

▼ **M4**

- (27) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (34) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.



▼ **M4**

*Apendicele 1*

DEFINIȚIE

**Substanța chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

**▼B****B.34. STUDIUL DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA O GENERAȚIE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

A se vedea introducerea generală partea B.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Niciuna.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Substanța de testat se administrează în doze crescătoare mai multor loturi de masculi și femele. Masculii trebuie tratați în timpul perioadei de creștere și pe durata a cel puțin unui ciclu spermatogen complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan), astfel încât substanța de testat să își producă efectele adverse asupra spermatogenezei.

Femelele din generația parentală (P) trebuie să fie tratate pe perioada a cel puțin două cicluri estrale complete astfel încât substanța de testat să producă efectele adverse asupra ciclului estral. Apoi animalele sunt împerecheate. Substanța de testat se administrează ambelor sexe în perioada împerecherii, iar apoi numai femelelor în perioada gestației și a alăptării. În cazul administrării prin inhalare, metoda va fi adaptată.

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Niciunul.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătire**

Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Se recomandă ca substanța de testat să se administreze în hrană sau în apa de băut. Și alte căi de administrare sunt acceptabile. Aceeași metodă de administrare va fi utilizată pentru toate animalele pe tot parcursul experimentului. Dacă se folosește un vehicul sau alți aditivi pentru a facilita administrarea, aceștia trebuie să nu aibă producă toxice. Tratamentul se face zilnic, șapte zile pe săptămână.

**▼B****1.6.2. Animale de experiență****Alegerea speciei**

Specia preferată este șoarecele sau șobolanul. Se folosesc animale sănătoase, care nu au mai fost supuse anterior altor experimente. Nu se recomandă folosirea liniilor cu fertilitate scăzută. Animalele de experiență trebuie caracterizate în termeni de specie, linie de descendență, sex, greutate și/sau vârstă.

Pentru o evaluare corespunzătoare a fertilității se studiază atât femelele, cât și masculii. Toate animalele tratate și cele martor trebuie înțărcați înainte de a începe tratamentul.

**Număr și sex**

Fiecare lot martor și fiecare lot tratat trebuie să conțină suficiente animale pentru a se asigura un număr de 20 de femele gestante în momentul sau aproape de momentul fătării.

Obiectivul este acela de a avea un număr suficient de femele gestante și descendenți pentru a asigura o evaluare reprezentativă a potențialului substanței de testat de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul matern la animalele din generația P, precum și suptul, creșterea și dezvoltarea la descendenții F<sub>1</sub>, de la concepție până la înțarcare.

**1.6.3. Condiții de testare**

Hrana și apa trebuie furnizate *ad libitum*. În apropierea parturii, femelele gestante se izolează în cuști speciale de fătare sau maternitate și pot primi materiale pentru construirea culcușului.

**1.6.3.1. Doze**

Se utilizează cel puțin trei doze și un lot martor. Dacă pentru administrarea substanței de testat se folosește un vehicul, acesta i se administrează lotului martor în volumul maxim folosit în experiment. Dacă substanța de testat conduce la scăderea consumului zilnic de hrană, ar putea fi necesar un lot martor hrănit identic. În mod ideal, dacă nu există limite impuse de natura fizică/chimică ori de efectele biologice ale substanței de testat, doza maximă trebuie să inducă efecte toxice, dar nu și mortalitate la animalele parentale (P). Doza sau dozele intermediare trebuie să inducă efecte toxice minime atribuibile substanței de testat, iar doza minimă nu trebuie să determine efecte adverse observabile la părinți sau descendenți. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj sau sub formă de capsule, doza trebuie stabilită în funcție de greutatea corporală a fiecărui animal în parte și ajustată săptămânal, în funcție de modificările în greutatea corporală. În cazul femelelor gestante, administrarea dozelor se poate face, dacă se dorește, în funcție de greutatea corporală în ziua 0 sau 6 de graviditate.

**1.6.3.2. Test-limită**

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, dacă o doză de cel puțin 1 000 mg/kg nu prezintă nicio interferență asupra capacității de reproducere, continuarea experienței poate fi inutilă. Dacă un studiu preliminar cu doza maximă relevă o toxicitate maternă evidentă, dar nu prezintă efecte adverse asupra fertilității, atunci nu mai sunt necesare studii cu alte doze.

## ▼B

1.6.3.3. *Desfășurarea testului***Schema de tratament**

Administrarea tratamentului zilnic la masculii parentali (P) poate începe când aceștia au între cinci și nouă săptămâni, după ce au fost înțărcați și aclimatizați timp de cel puțin cinci zile. La șobolani, administrarea substanței continuă timp de 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere (la șoareci, timp de opt săptămâni). Masculii trebuie sacrificați și examinați fie la sfârșitul perioadei de împerechere, fie, alternativ, pot fi păstrați primind regimul alimentar prevăzut în test, în vederea unei împerecheri ulterioare, fiind sacrificați și examinați înainte de terminarea studiului. În cazul femelelor parentale (P), administrarea zilnică trebuie să înceapă după cel puțin cinci zile de aclimatizare și să continue timp de cel puțin două săptămâni înainte de împerechere. Administrarea zilnică a dozei de tratament femelelor P continuă în perioada de trei săptămâni de împerechere, pe parcursul gestației și până la înțarcarea descendenților F<sub>1</sub>. Se poate avea în vedere modificarea schemei de tratament pe baza altor informații disponibile cu privire la substanța de testat cum ar fi inducerea metabolismului sau bioacumularea.

**Procedura de împerechere**

Pentru studiile de toxicitate privind reproducerea, schemele de împerechere folosite pot fi: un mascul la o femelă (1:1) sau un mascul la două femele (1:2).

În varianta împerecherii 1:1, o femelă este plasată împreună cu același mascul până când se produce fecundarea sau trec trei săptămâni. În fiecare dimineață femelele trebuie examinate pentru a identifica prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua „0” a sarcinii este definită ca fiind ziua în care se identifică prezența dopului vaginal sau a spermei în vagin.

Animalele care nu s-au împerecheat trebuie evaluate pentru a stabili cauza aparentei infertilități.

Evaluarea poate presupune posibilități suplimentare de împerechere cu alte exemplare dovedite ca fiind apte, examinarea microscopică a organelor de reproducere, precum și examinarea ciclului estral și a spermatogenezei.

**Mărimea seriei de pui**

Animalele tratate în timpul studiului de fertilitate fată normal și își cresc pui până la înțarcare, fără a se face o standardizare numerică a seriei de pui.

Dacă are loc standardizarea numerică, se recomandă următoarea metodă. Între zilele 1 și 4 după fătare se ajustează numărul feților, eliminând surplusul de pui prin selecție astfel încât să se obțină un număr de patru pui masculi și patru pui femele pentru fiecare serie de pui.

Dacă numărul de masculi sau femele fătate nu permite obținerea unui număr de patru pui de fiecare sex, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, cinci masculi și trei femele). Ajustările nu se aplică în cazul seriilor cu mai puțin de opt pui.

**▼B****1.6.4. Observațiile**

Pe toată durata testului, fiecare animal trebuie observat cel puțin o dată pe zi. Se înregistrează modificările comportamentale semnificative, semnele unor fătări dificile sau prelungite și toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. În timpul perioadelor de pre-împerechere și de împerechere se măsoară zilnic consumul de hrană. După fătare și în perioada lactației, consumul de hrană (și de apă, în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară în ziua în care se cântăresc puii. Masculii și femelele din generația P se cântăresc în prima zi a tratamentului, apoi săptămânal. Aceste observații se înregistrează pentru fiecare animal adult în parte.

Perioada gestației trebuie calculată din ziua 0 de graviditate. Fiecare serie de pui proveniți de la o gestantă trebuie examinat imediat după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, numărul de pui vii și morți, precum și prezența anomaliilor macroscopice.

Puii morți și puii sacrificați în ziua a patra trebuie conservați și studiați în vederea identificării posibilelor anomalii. Puii vii se numără și se cântăresc în dimineața de după naștere, în ziua a patra și a șaptea, ulterior săptămânal până la încheierea studiului, când animalele se cântăresc individual.

Anomaliile fizice sau comportamentale observate la femele sau la descendenți trebuie înregistrate.

**1.6.5. Patologie****1.6.5.1. Autopsia**

În momentul sacrificării sau al decesului în timpul studiului, toate animalele din generația P sunt supuse unui examen macroscopic în vederea evidențierii anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice, o atenție deosebită acordându-se organelor sistemului de reproducere. Puii muribunzi sau morți se examinează în vederea decelării eventualelor anomalii.

**1.6.5.2. Examen histopatologic**

În vederea examinării microscopice, de la toate animalele P se conservă următoarele organe: ovare, uter, cervix, vagin, testicule, epididim, vezicule seminale, prostată, glanda coagulantă, glanda pituitară și organul sau organele țintă. În cazul în care aceste organe nu au fost examinate în cadrul altor studii cu doză multiplă, se efectuează un examen microscopic al tuturor animalelor din lotul martor și din lotul tratat cu doza maximă și, dacă este posibil, al animalelor care mor pe perioada studiului.

Dacă la aceste animale se evidențiază anomalii, organele respective se examinează la toate celelalte animale P. În aceste cazuri, se examinează microscopic toate țesuturile care prezintă modificări patologice macroscopice. După cum s-a arătat în paragraful referitor la procedura de împerechere, organele de reproducere ale animalelor suspectate de infertilitate trebuie examinate microscopic.

**▼B****2. DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de masculi fertili, numărul de femele gestante, tipurile de modificări și procentul de animale care prezintă fiecare tip de modificare.

Dacă este posibil, rezultatele se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Poate fi folosită orice metodă statistică recunoscută.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- specia/linia folosită;
- răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și viabilitatea;
- momentul morții în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit studiului;
- tabel cu greutatea corporală pentru fiecare serie de pui, greutatea corporală medie a puilor și greutatea corporale individuale la încheierea studiului;
- efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, descendenților și evoluției postnatale;
- ziua observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;
- greutatea corporală a animalelor P;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor observațiilor microscopice;
- tratarea statistică a rezultatelor, după caz;
- discutarea rezultatelor;
- interpretarea rezultatelor.

**3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

**▼B****B.35. STUDIUL DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA A DOUĂ GENERAȚII****1. METODĂ**

Această metodă corespunde Orientării 416 (2001) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Această metodă de testare a reproducerii pe durata a două generații este concepută pentru a furniza informații generale privind efectele unei substanțe de testat asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin, inclusiv asupra funcției gonadice, ciclului estral, comportamentului de împerechere, concepției, gestației, fătării, alăptării și înțărării și asupra creșterii și dezvoltării descendenților. Studiul poate furniza, de asemenea, informații privind efectele substanței de testat asupra morbidității și mortalității neonatale și date preliminare privind toxicitatea asupra dezvoltării prenatale și postnatale și poate constitui un ghid pentru testele ulterioare. Această metodă de testare nu studiază doar creșterea și dezvoltarea generației  $F_1$ , ci evaluează, de asemenea, integritatea și funcționarea sistemelor de reproducere masculin și feminin, precum și creșterea și dezvoltarea generației  $F_2$ . Pentru informații suplimentare privind toxicitatea asupra dezvoltării și deficiențele funcționale, fie pot fi incluse în acest protocol secvențe suplimentare de studiu, consultând metodele pentru toxicitatea asupra dezvoltării și/sau neurotoxicitatea asupra dezvoltării, după caz, fie aceste puncte finale pot fi studiate în cadrul unor studii separate, utilizând metodele de testare adecvate.

**1.2. PRINCIPIILE METODEI DE TESTARE**

Substanța de testat se administrează în doze graduale mai multor grupuri de masculi și femele. Substanța se administrează masculilor din generația P în timpul creșterii și cel puțin pe durata unui ciclu spermatogenetic complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan) pentru a pune în evidență efectele adverse asupra spermatogenezei. Efectele asupra spermei se determină în funcție de mai mulți parametri ai spermei (de exemplu, morfologia și motilitatea spermatozoidelor) și prin preparate de țesut și examene histopatologice detaliate. Dacă sunt disponibile date privind spermatogeneza dintr-un studiu anterior cu doze repetate cu o durată suficientă, de exemplu un studiu de 90 de zile, masculii din generația P nu este necesar să fie incluși în evaluare. Se recomandă totuși ca eșantioanele și înregistrările digitale ale spermei din generația P să fie păstrate, pentru a permite o evaluare ulterioară. Substanța se administrează femelelor din generația P în timpul creșterii și pe durata mai multor cicluri estrale complete pentru a detecta orice efecte adverse produse asupra normalității ciclului estral de către substanța de testat. Substanța de testat se administrează animalelor din generația parentală (P) în perioada împerecherii, pe durata gestațiilor ulterioare și până la înțărarea descendenților lor din generația  $F_1$ . După înțărare, substanța se administrează în continuare descendenților  $F_1$  în perioada de creștere și la vârsta adultă și în perioada de împerechere și producere a generației  $F_2$ , până la înțărarea generației  $F_2$ .

Observațiile clinice și examenele patologice se efectuează asupra tuturor animalelor pentru detectarea semnelor de toxicitate, acordându-se o atenție specială efectelor asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin și asupra creșterii și dezvoltării descendenților.

**▼B****1.3. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.3.1. Selectarea speciei de animale**

Specia preferată pentru testare este șobolanul. Dacă se utilizează o altă specie, această opțiune se justifică și este necesar să se facă modificările adecvate. Nu se utilizează liniile cu o fecunditate scăzută sau o incidență ridicată bine-cunoscută a defectelor de dezvoltare. La începutul studiului, variațiile în greutate între animalele utilizate trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex.

**1.3.2. Condiții de adăpostire și de hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență, se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a încorpora în hrană substanța de testat, dacă se administrează prin această metodă.

Animalele se adăpostesc individual sau în grupuri mici de același sex. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. După constatarea copulației, femelele împerecheate se adăpostesc individual în cuști amenajate pentru fătare și maternitate. Șobolanii împerecheați pot fi adăpostiți în grupuri mici, dar se separă cu una sau două zile înainte de fătare. Când se apropie momentul fătării, animalelor împerecheate li se asigură materialele adecvate și determinate pentru construirea cuibului.

**1.3.3. Pregătirea animalelor**

Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 5 zile înainte și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Pentru animalele de experiență se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și/sau vârsta. Este necesar să se cunoască legăturile colaterale dintre animale, pentru a se evita împerecherea între cosangvini. Animalele se distribuie aleatoriu în grupurile martor și de testare (se recomandă gruparea în funcție de greutate). Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea lor să fie reduse la minimum. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare. La animalele din generația P, identificarea se face înainte de începerea tratamentului. La animalele din generația F<sub>1</sub>, identificarea se face la înțărare, pentru animalele selectate pentru împerechere. Pentru toate animalele selectate din generația F<sub>1</sub> se înregistrează cuibul de origine. În plus, dacă se au în vedere cântărirea individuală a puilor sau orice alte teste funcționale, se recomandă ca identificarea individuală a puilor să se efectueze cât mai curând posibil după fătare.

Animalele din generația P trebuie să aibă circa 5 până la 9 săptămâni la începutul tratamentului. Se recomandă ca animalele din toate grupurile de tratament să aibă, în cea mai mare măsură posibilă, greutate și vârstă apropiate.



**▼B****1.4. MOD DE LUCRU****1.4.1. Numărul și sexul animalelor**

Fiecare grup de tratament și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de animale pentru a obține, de preferat, cel puțin 20 de femele gestante în momentul sau în apropierea momentului fătării. În cazul substanțelor care cauzează efecte nedorite corelate tratamentului (de exemplu, sterilitate, toxicitate excesivă, la cea mai mare doză), există riscul ca acest lucru să nu fie posibil. Obiectivul este obținerea unui număr suficient de femele gestante pentru a asigura o evaluare relevantă a potențialului substanței de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul mamei și alăptarea, creșterea și dezvoltarea descendenților  $F_1$  de la concepție până la maturitate, precum și dezvoltarea descendenților acestora ( $F_2$ ), până la înțărare. Prin urmare, faptul că nu se obține numărul dorit de animale gestante (20) nu invalidează obligatoriu studiul și se evaluează de la caz la caz.

**1.4.2. Pregătirea dozelor**

Se recomandă ca substanța de testat să se administreze oral (în hrană, în apa potabilă sau prin gavaj), cu excepția cazului în care o altă cale de administrare (de exemplu, prin absorbție dermică sau inhalare) este considerată a fi mai adecvată.

Dacă este necesar, substanța de testat se dizolvă într-un vehicul adecvat. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi o soluție/emulsie în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior o altă soluție posibilă într-un alt vehicul. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Se determină stabilitatea substanței de testat în vehicul.

**1.4.3. Dozare**

Se utilizează cel puțin trei niveluri ale dozei și un martor paralel. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței de testat, doza cea mai mare se alege astfel încât să inducă toxicitate, dar nu decesul sau o suferință profundă. În cazul unei mortalități neașteptate, studiile cu o rată a mortalității mai mică decât circa 10 procente la animalele din generația parentală (P) este totuși acceptabil, în mod normal. Se alege o serie de administrare în ordine descrescătoare a dozelor, pentru a pune în evidență o eventuală relație doză-efect și nivelul dozei fără efect advers vizibil (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și este deseori de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze. Pentru studiile cu administrare în hrană, intervalul între doze nu trebuie să depășească un factor de trei. Nivelurile dozelor se selectează ținând seama de datele existente privind toxicitatea, în special de rezultatele studiilor cu doze repetate. Se iau, de asemenea, în considerare orice informații disponibile cu privire la metabolismul și cinetica compusului de testat sau ale materialelor înrudite. În plus, informațiile în cauză se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra că regimul de dozare este adecvat.

**▼B**

Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței de testat se utilizează un vehicul. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor sunt manipulate în același fel ca animalele din grupul de tratament. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum utilizat de vehicul. Dacă substanța de testat se administrează în amestec cu hrana și provoacă o reducere a aportului și consumului de hrană, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel. Alternativ, se pot utiliza date obținute din studii controlate, concepute pentru evaluarea efectelor unui consum redus de hrană asupra parametrilor reproducerii în locul unui grup martor simultan, hrănit în paralel.

Se iau în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției de substanță de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care ar putea modifica caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării nutriționale a animalelor.

#### 1.4.4. **Testul-limită**

Dacă un studiu oral cu o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării în amestec cu hrana sau apa potabilă, un procentaj echivalent în hrana sau apa potabilă, efectuat conform procedurilor descrise pentru prezentul studiu, nu produce efecte toxice evidente nici la animalele din generația parentală, nici la descendenții acestora și, dacă, pe baza datelor privind compușii înrudiți structural și/sau metabolic, nu se prevede niciun efect toxic, este posibil să nu fie necesar un studiu complet cu mai multe niveluri ale dozei. Se efectuează testul-limită, cu excepția cazului în care expunerea umană indică necesitatea de a utiliza un nivel al dozei administrate oral mai ridicat. În cazul altor căi de administrare, precum inhalarea sau aplicarea cutanată, proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat, precum solubilitatea, pot indica și limita, deseori, nivelul maxim de expunere posibil de realizat.

#### 1.4.5. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța de testat zilnic, 7 zile din 7. Se preferă administrarea pe cale orală (în amestec cu hrana, apa potabilă sau prin gavaj). Alegerea unei alte căi de administrare trebuie justificată și poate impune modificări adecvate. Substanța de testat se administrează prin aceeași metodă tuturor animalelor, pe durata adecvată a experimentului. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj, se utilizează o sondă gastrică. Volumul de lichid administrat o singură dată nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală (0,4 ml/100 g greutate corporală este volumul maxim pentru uleiul de porumb), cu excepția cazului soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive, care provoacă, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai ridicate, se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant la toate nivelurile dozelor. În studiile efectuate prin gavaj, în mod normal puilor li se administrează substanța de testat doar în amestec cu lapte, până la începerea dozării indirecte după înțarcarea lor. În studiile în care se utilizează amestecul în hrană sau apa potabilă, puilor li se administrează substanța de testat direct din momentul în care încep să se hrănească singuri, în ultima săptămână a perioadei de alăptare.

**▼B**

Pentru substanțele administrate în amestec cu hrana sau apa potabilă, este important ca echilibrul nutrițional și hidric normal să nu fie afectat de cantitatea de substanță de testat administrată. Dacă substanța de testat se administrează în amestec cu hrana se poate utiliza fie o concentrație constantă în hrană (ppm), fie o doză constantă raportată la greutatea corporală a animalului; se specifică opțiunea utilizată. În cazul unei substanțe administrate prin gavaj, doza se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi și se ajustează cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant în funcție de greutatea corporală a animalului. La ajustarea în funcție de greutate a dozei administrate prin gavaj, se ține seama de informațiile privind distribuția placentară.

#### 1.4.6. **Programe experimentale**

Administrarea zilnică a substanței de testat la femelele și masculii din generația parentală (P) începe la vârsta de 5-9 săptămâni. Administrarea zilnică a substanței de testat la femelele și masculii din generația F<sub>1</sub> începe la înțarcare; se ține seama de faptul că, în cazul substanțelor de testat administrate în amestec cu hrana sau apa potabilă, expunerea directă a puilor din generația F<sub>1</sub> la substanța de testat poate începe încă din perioada de alăptare. La ambele sexe (P și F<sub>1</sub>), tratamentul continuă timp de cel puțin 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere. Tratamentul continuă la ambele sexe în cele 2 săptămâni ale perioadei de împerechere. Masculii sunt eutanasiați și examinați în momentul în care nu mai sunt necesari pentru evaluarea efectelor asupra reproducerii. La femelele din generația parentală (P), tratamentul continuă pe întreaga perioadă a gestației și până la înțarcarea descendenților F<sub>1</sub>. Se ia în considerare modificarea programului de administrare în funcție de informațiile disponibile privind substanța de testat, inclusiv date existente privind toxicitatea, inducția metabolică și bioacumulare. Doza administrată fiecărui animal se calculează, în mod normal, pe greutatea corporală individuală la ultima cântărire. Cu toate acestea, ajustarea dozelor se face cu atenție în ultimul trimestru de gestație.

Tratamentul masculilor și femelelor din generațiile P și F<sub>1</sub> continuă până la sacrificare. Toate animalele adulte din generațiile P și F<sub>1</sub>, masculi și femele, sunt eutanasiate când nu mai sunt necesare pentru evaluarea efectelor asupra reproducerii. Descendenții F<sub>1</sub> care nu sunt selectați pentru împerechere și toți descendenții F<sub>2</sub> sunt eutanasiați după înțarcare.

#### 1.4.7. **Procedura de împerechere**

##### 1.4.7.1. *Împerecherea generației parentale (P)*

Pentru fiecare împerechere, se adăpostește fiecare femelă cu un singur mascul de la același nivel al dozei (împerechere 1:1), până când are loc copulația sau expiră un termen de 2 săptămâni. În fiecare zi, femele sunt examinate pentru a detecta prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 de gestație se definește ca ziua în care se observă spermă sau un dop vaginal. În cazurile în care împerecherea eșuează, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculii care și-au dovedit capacitatea reproductivă. Cuplurile împerecheate se identifică clar în cadrul datelor. Se evită împerecherea cosangvinilor.

**▼B****1.4.7.2. Împerecherea generației  $F_1$** 

Pentru împerecherea descendenților  $F_1$  se selectează cel puțin un mascul și o femelă din fiecare cuib, la înțarcare, pentru împerecherea cu alți pui de la același nivel al dozei, dar din cuiburi diferite, pentru producerea generației  $F_2$ . Selecția puilor din fiecare cuib se face aleatoriu dacă nu există diferențe majore între puii din același cuib din punctul de vedere al greutatei corporale și a aspectului fizic. Dacă se observă astfel de diferențe, se selectează cei mai buni reprezentanți din fiecare cuib. Pragmatic, selecția se face cel mai ușor în funcție de greutatea corporală, dar este posibil ca selecția în funcție de aspect să fie mai relevantă. Descendenții  $F_1$  nu se împerechează înainte de a fi atins maturitatea sexuală deplină.

Cuplurile fără descendenți sunt evaluate pentru determinarea cauzei aparente a infertilității. Evaluarea include proceduri precum oportunități suplimentare de împerechere cu alți masculi sau femele care și-au dovedit capacitatea reproductivă, examinarea microscopică a organelor de reproducere și analiza ciclurilor estrale și a spermatoogenezei.

**1.4.7.3. A doua împerechere**

În anumite situații, precum modificări ale dimensiunii cuibului corelate cu tratamentul sau observarea unor efecte echivoce la prima împerechere, se recomandă a doua împerechere a adulților P sau  $F_1$ , pentru a produce un al doilea cuib. Se recomandă reîmperecherea femelelor sau masculilor care nu au produs un cuib cu animale de sex opus care și-au dovedit capacitățile reproductive. Dacă se consideră necesară producerea celui de-al doilea cuib la oricare dintre generații, animalele se împerechează din nou la aproximativ o săptămână după înțarcarea cuibului anterior.

**1.4.7.4. Dimensiunea cuibului**

Animalele se lasă să fete normal și să își crească descendenții până la înțarcare. Standardizarea dimensiunii cuibului este opțională. Dacă se recurge la standardizare, se descrie detaliat metoda utilizată.

**1.5. OBSERVAȚIILE****1.5.1. Observațiile clinice**

Se efectuează zilnic un examen clinic general, iar în cazul administrării prin gavaj, planificarea examenului clinic ține seama de perioada de vârf a efectelor după administrare. Se înregistrează modificările de comportament, semnele de fătare dificilă sau prelungită și orice semne de toxicitate. Cel puțin o dată pe săptămână fiecare animal este supus unui examen mai detaliat, care se poate efectua, pentru conveniență, simultan cu cântărirea animalului. De două ori pe zi sau o singură dată pe zi la sfârșitul săptămânii, dacă este cazul, fiecare animal este supus unui examen pentru stabilirea morbidității sau decesului.

**▼B****1.5.2. Greutatea corporală și consumul de hrană/apă ale animalelor părinți**

Animalele părinți (P și F<sub>1</sub>) sunt cântărite în prima zi de tratament și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Femelele părinți (P și F<sub>1</sub>) sunt cântărite cel puțin în zilele de gestație 0, 7, 14 și 20 sau 21, iar în perioada de alăptare în zilele în care sunt cântăriți puii și în ziua în care sunt sacrificate. Aceste observații se înregistrează individual pentru fiecare animal adult. În perioada de dinainte de împerechere și în perioada de gestație, consumul de hrană se măsoară cel puțin o dată pe săptămână. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână, dacă substanța de testat se administrează în apă.

**1.5.3. Ciclul estral**

Lungimea și normalitatea ciclului estral se evaluează la femelele P și F<sub>1</sub> prin frotiuri vaginale înainte de împerechere și în perioada de împerechere, opțional, până la obținerea de probe ale împerecherii. La prelevarea de celule vaginale/cervicale se evită cu atenție deteriorarea mucoaselor și, prin urmare, inducerea pseudogestației (1).

**1.5.4. Parametrii de evaluare a spermei**

La sacrificarea tuturor masculilor din generațiile P și F<sub>1</sub>, se înregistrează greutatea testiculelor și a epididimului, păstrându-se câte un exemplar din fiecare organ pentru examenul histopatologic (a se vedea secțiunile 1.5.7, 1.5.8.1). Restul testiculelor și epididimelor de la un subgrup de cel puțin zece masculi din fiecare grup de masculi din generațiile P și F<sub>1</sub> se utilizează pentru numărarea spermatozoidelor rezistente la omogenizare și, respectiv, a rezervelor de spermatozoizi din coada epididimului. De la același subgrup de masculi se colectează spermă din coada epididimului sau din canalul deferent pentru evaluarea motilității și a morfologiei spermatozoidelor. Dacă se observă efecte corelate cu tratamentul sau dacă există dovezi din alte studii privind posibilele efecte asupra spermatogenezei, se efectuează o evaluare a spermei tuturor masculilor din grupurile tratate cu diverse niveluri ale dozei; în caz contrar, evaluarea spermei se poate restrânge la masculii din generațiile P și F<sub>1</sub> din grupul martor și grupul tratat cu cea mai mare doză.

Se determină numărul total de spermatide testiculare rezistente la omogenizare și numărul de spermatozoizi din coada epididimului (2) (3). Rezervele de spermatozoizi din coada epididimului se pot calcula din concentrația și volumul spermei din suspensia utilizată pentru realizarea evaluărilor calitative și numărul de spermatozoizi recuperați din mărunțirea și/sau omogenizarea ulterioară a țesutului caudal rămas. Evaluarea numerică se efectuează pe subgrupul de masculi selectați din grupurile tratate la toate nivelurile dozei imediat după sacrificarea animalelor, cu excepția cazului în care se fac înregistrări video sau digitale sau a cazului în care eșantioanele sunt înghețate și analizate ulterior. În aceste cazuri, se poate proceda mai întâi la analizarea grupurilor martor și a grupului tratat cu doza cea mai mare. Dacă nu se observă efecte corelate cu tratamentul (de exemplu, efecte asupra numărului de spermatozoizi, motilității și morfologiei spermatozoidelor), nu este necesar să se analizeze grupurile tratate cu alte doze. Dacă la grupul tratat cu doza cea mai mare se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici.

**▼B**

Motilitatea spermei din epididim (sau canalele deferente) se evaluează sau se înregistrează pe suport video imediat după sacrificare. Sperma se colectează astfel încât să se evite deteriorarea organelor și se diluează pentru analiza motilității utilizând metode acceptabile (4). Procentajul de spermatozoizi cu motilitate progresivă se determină subiectiv sau obiectiv. Dacă se face o analiză a motilității asistată de computer (5) (6) (7) (8) (9) (10), calculul motilității progresive se bazează pe limite definite de utilizator pentru viteza medie pe traiectorie, rectiliniaritate și indicele liniar. Dacă eșantioanele sunt înregistrate pe suport video (11) sau se înregistrează imagini în alt mod în momentul autopsiei, analiza ulterioară poate fi restrânsă doar la masculii P și F<sub>1</sub> din grupul martor și grupul tratat la cea mai mare doză, cu excepția cazului în care se observă efecte corelate cu tratamentul; în acest caz, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici. În absența unei imagini video sau digitale, toate eșantioanele prelevate de la toate grupurile de tratament se analizează în momentul autopsiei.

Se efectuează o evaluare morfologică a unui eșantion de spermă colectat din epididim (sau canalul deferent). Spermatozoizii (cel puțin 200 per eșantion) se examinează ca preparate fixe, lichide (12) și clasificați ca normali sau anormali. Printre anomaliile morfologice ale spermatozoizilor se numără fuziunea, capete izolate și capete și/sau cozi malformate. Evaluarea vizează subgrupul selectat de masculi din toate grupurile tratate cu diverse doze și se efectuează fie imediat după sacrificare, fie ulterior, pe baza înregistrărilor video sau digitale. Odată fixate, frotiurile pot fi citite ulterior. În aceste cazuri, se poate proceda mai întâi la analizarea grupurilor martor și a grupului tratat cu doza cea mai mare. Dacă nu se observă efecte corelate cu tratamentul (de exemplu, efecte asupra morfologiei spermatozoizilor), nu este necesar să se analizeze grupurile tratate cu alte doze. Dacă la grupul tratat cu doza cea mai mare se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici.

Dacă oricare dintre parametri de evaluare a spermei menționați anterior a fost analizat în cadrul unui studiu de toxicitate sistemică de cel puțin 90 de zile, nu este obligatoriu ca acesta să fie reevaluat în cadrul studiului pe două generații. Cu toate acestea, se recomandă păstrarea de eșantioane sau înregistrări digitale ale spermei din generația P, pentru a permite efectuarea unor evaluări ulterioare, dacă este cazul.

#### 1.5.5. **Descendenți**

Se examinează fiecare cuib, cât mai curând posibil după fătare (ziua de alăptare 0) pentru stabilirea numărului de pui și a sexului acestora, a numărului de pui fâțați morți, a numărului de pui vii și a prezenței unor anomalii macroscopice. Este de preferat ca puii găsiți morți în ziua 0, dacă nu sunt macerați, să fie examinați pentru detectarea posibilelor anomalii și determinarea cauzei morții și conservați. Puii vii se numără și se cântăresc individual, la naștere (ziua de alăptare 0) sau în ziua 1 și, ulterior, în zilele normale de cântărire, de exemplu, în zilele 4, 7, 14 și 21 de alăptare. Se înregistrează orice anomalități fizice sau comportamentale observate la femele sau descendenți.

**▼B**

Se urmărește dezvoltarea fizică a descendenților, în special prin creșterea greutateii corporale. Alți parametri fizici (de exemplu, deschiderea urechilor și a ochilor, erupția dinților, creșterea blănii) pot oferi informații suplimentare, dar aceste date se evaluează, de preferință, în contextul datelor privind maturitatea sexuală (de exemplu, vârsta și greutatea corporală la deschiderea vaginului sau separarea balano-prepușială) (13). Se recomandă efectuarea unor investigații funcționale (de exemplu, activitatea motorie, funcțiile senzoriale, ontogeneza reflexelor) asupra descendenților  $F_1$  înainte și/sau după înțărare, în special a celor legate de maturizarea sexuală, dacă astfel de investigații nu sunt incluse în studii separate. La puii înțărcați din generația  $F_1$  selectați pentru împerechere se determină vârsta la care survine deschiderea vaginului sau separarea prepușială. În ziua 0 după fătare se măsoară distanța ano-genitală la puii din generația  $F_2$ , dacă se constată modificări ale proporției de masculi și femele sau ale momentului maturizării sexuale la generația  $F_1$ .

Se pot omite observațiile funcționale la grupurile care prezintă semne clare ale unor efecte adverse (de exemplu, o scădere semnificativă a greutateii corporale etc.). Dacă se efectuează investigații funcționale, acestea nu se efectuează asupra puilor selectați pentru împerechere.

**1.5.6. Autopsia**

În momentul sacrificării sau al decesului în cursul studiului, toate animalele din generațiile parentale (P și  $F_1$ ), toți puii care prezintă anormalități externe sau semne clinice, precum și câte un pui/sex/cuib selectat aleatoriu din generațiile  $F_1$  și  $F_2$  sunt supuși unei autopsii pentru determinarea anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice. Se acordă o atenție specială organelor sistemului de reproducere. Puii care sunt eutanasiați în stare muribundă sau puii decedați, dacă nu sunt macerați, sunt examinați pentru determinarea posibilelor defecte și/sau a cauzei decesului și conservați.

Se examinează uterele tuturor femelelor primipare, astfel încât să nu se compromită examenul histopatologic, pentru determinarea prezenței și a numărului de locuri de implantare.

**1.5.7. Greutatea organelor**

În momentul sacrificării, se stabilește greutatea corporală și greutatea următoarelor organe ale tuturor animalelor din generațiile parentale P și  $F_1$  (organele pereche se cântăresc individual):

- uter, ovare;
- testicule, epididime (greutate totală și greutatea cozii);
- prostată;
- vezicule seminale cu glande coagulante și fluidele lor și prostată (împreună);
- creier, ficat, rinichi, splină, glandele pituitare, tiroidă și suprarenale, precum și organele țintă cunoscute.

Se stabilește greutatea corporală la sacrificare a puilor din generațiile  $F_1$  și  $F_2$  selectați pentru autopsie. Se cântăresc următoarele organe ale puiului/sexului/cuibului selectat aleatoriu (a se vedea punctul 1.5.6): creier, splină și timus.

**▼B**

Dacă este posibil, rezultatele autopsiei macroscopice și greutatea organelor se analizează în corelație cu observațiile altor studii cu doze repetate.

### 1.5.8. **Histopatologie**

#### 1.5.8.1. *Animale din generațiile parentale*

Se fixează și se conservă într-un mediu adecvat pentru examenul histopatologic următoarele organe și țesuturi ale animalelor din generațiile parentale (P și F<sub>1</sub>) sau eșantioane reprezentative ale acestora.

— vagin, uter cu cervix și ovare (conservate într-un fixativ adecvat);

— un testicul (conservat în fixator Bouin sau fixator analog), un epididim, vezicule seminale, prostată și glanda coagulantă;

— organul sau organele țintă identificate anterior de la toate animalele P și F<sub>1</sub> selectate pentru împerechere.

Se efectuează un examen histopatologic complet asupra organelor și țesuturilor conservate enumerate anterior de la toate animalele P și F<sub>1</sub> selectate pentru împerechere din grupul martor și grupul tratat cu cea mai mare doză. Examinarea ovarelor animalelor P este opțională. Se examinează, de asemenea, organele care prezintă modificări corelate cu tratamentul de la grupurile tratate cu doza cea mai mică și cu o doză intermediară, pentru a facilita determinarea NOAEL. În plus, se efectuează un examen histopatologic asupra organelor de reproducere ale animalelor tratate cu doza cea mai mică și o doză intermediară care sunt suspectate de fertilitate scăzută, de exemplu, cele care nu s-au împerecheat, nu au conceput, nu au generat sau nu au fătat descendenți sănătoși sau la care au fost afectate ciclul estral sau numărul, motilitatea sau morfologia spermatozoizilor. Se examinează toate leziunile macroscopice, precum atrofia sau tumorile.

Se efectuează un examen histopatologic detaliat al testiculelor (utilizând, de exemplu, fixator Bouin, încapsulare în parafină și secțiuni transversale de 4-5 μm grosime), pentru a identifica efectele corelate cu tratamentul, precum retenția de spermatozoizi, straturi sau tipuri de celule germinale absente, celule multinucleate gigant sau inserția celulelor spermatogene în lumen (14). Examinarea epididimului intact vizează capul, corpul și coada și se poate realiza prin examinarea unei secțiuni longitudinale. Se examinează epididimul pentru detectarea infiltrației de leucocite, modificarea tipurilor de celule preponderente, tipuri de celule aberante și fagocitoza spermatozoizilor. Pentru examinarea organelor masculine de reproducere se poate utiliza colorarea cu periodic acid Schiff (PAS) și hematoxilină.

În perioada de după alăptare, ovarul trebuie să conțină foliculi primordiali și foliculi în creștere, precum și marile corpuri galbene ale lactației. Examenul histopatologic relevă o scădere calitativă a populației de foliculi primordiali. Se efectuează o analiză cantitativă a foliculilor primordiali la femelele F<sub>1</sub>; numărul de animale, selectarea secțiunii ovariene și dimensiunea eșantionului de secțiuni trebuie să corespundă din punct de vedere statistic procedurii de evaluare utilizate. Examenul include numărarea foliculilor primordiali, care pot fi amestecați cu foliculi mici în creștere, pentru compararea uterelor tratate cu uterale martor (15) (16) (17) (18) (19).



**▼B**1.5.8.2. *Pui înfărcați*

Se fixează și se conservă într-un mediu adecvat pentru examenul histopatologic țesuturile care prezintă anormalități macroscopice și organele țintă de la toți puii care prezintă anomalii externe sau semne clinice, precum și de la puiul/sexul/cuibul selectat aleatoriu din generațiile  $F_1$  și  $F_2$  care nu au fost selectați pentru împerechere. Se face o descriere histopatologică a țesuturilor conservate, acordându-se o atenție specială organelor sistemului de reproducere.

2. **DATE**2.1. **PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Datele se prezintă individual și sub forma unui rezumat tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de tratament și fiecare generație, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de observații asupra animalelor parentale și descendenților, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind cuiburile.

Datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată, general acceptată; metodele statistice se selectează în etapa de concepere a studiului și se justifică. Modelele statistice doză-reacții pot fi utile pentru analiza datelor. Raportul trebuie să includă informații suficiente privind metoda de analiză și programul computerizat utilizate pentru ca un revizor/statistician independent să poată reevalua și reface analiza.

2.2. **EVALUAREA REZULTATELOR**

Rezultatele acestui studiu de toxicitate asupra reproducerii pe două generații se evaluează în funcție de efectele observate, inclusiv rezultatele autopsiei și ale examenului microscopic. Evaluarea include relația sau absența unei relații între doză de substanță de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra producerii și asupra performanțelor descendenților, modificări ale greutatei corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice. La evaluarea rezultatelor se iau în considerare proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat și, dacă sunt disponibile, date privind toxicocinetica.

Un test de toxicitate efectuat corespunzător generează o estimare satisfăcătoare a nivelului la care nu se observă efecte și permite înțelegerea efectelor adverse asupra reproducerii, fătării, alăptării și dezvoltării postnatale, inclusiv asupra creșterii și dezvoltării sexuale.

**▼B****2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Un studiu de toxicitate asupra reproducerii pe două generații furnizează informații privind efectele expunerii repetate la o substanță în toate etapele ciclului de reproducere. Studiul furnizează în special informații privind parametrii reproducerii și asupra dezvoltării, creșterii, maturizării și supraviețuirii descendenților. Rezultatele studiului se interpretează în strânsă legătură cu rezultatele studiilor de toxicitate subcronică, de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine, de toxicocinetică și ale altor studii disponibile. Rezultatele acestui studiu pot fi utilizate pentru a se determina necesitatea efectuării altor teste asupra unei substanțe. Extrapolarea rezultatelor studiului la om este valabilă într-o măsură restrânsă. Rezultatele studiului sunt mai utile pentru a furniza informații privind nivelurile fără efecte adverse și nivelul admisibil de expunere umană (20) (21) (22) (23).

**3. RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații:

Substanța de testat:

- natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare;
- puritate.

Vehicul (dacă este cazul):

- justificarea vehiculului ales, în cazul unui vehicul altul decât apa.

Animalele de experiență:

- specie/sușă utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursă, condiții de adăpostire, hrană, materiale pentru construirea cuibului etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutului testului.

Condiții de testare:

- motivație pentru nivelul selectat al dozei;
- detalii privind formula/includerea în hrană a substanței de testat, concentrația obținută;
- stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- transformarea concentrației de substanță de testat în hrană/apa potabilă (ppm) în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei.

**▼B**

## Rezultate:

- consumul de hrană și consumul de apă, dacă este disponibil, eficiența hranei (creștere a greutatei corporale per gram de hrană consumată) și consumul de material testat la animalele P și F<sub>1</sub>, exceptând perioada de coabitare și cel puțin ultima treime a perioadei de alăptare;
- date privind absorbția (dacă sunt disponibile);
- date privind greutatea corporală a animalelor P și F<sub>1</sub> selectate pentru împerechere;
- date privind greutatea cuibului și a puilor;
- greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea absolută și relativă a organelor la animalele parentale;
- natura, gravitatea și durata semnelor clinice (dacă sunt reversibile sau nu);
- data decesului în cursul studiului sau date privind animalele care au supraviețuit până la sacrificare;
- date privind reacția toxică în funcție de sex și doză, inclusiv indici de împerechere, fertilitate, gestație, fătare, viabilitate și alăptare; raportul prezintă cifrele utilizate pentru calcularea indicilor;
- efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, descendenților, creșterii postnatale etc.;
- concluziile autopsiei;
- o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
- numărul de femele P și F<sub>1</sub> cu ciclul normal și durata ciclului;
- numărul total de spermatozoizi în coada epididimului, procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă, procentajul de spermatozoizi normali din punct de vedere morfologic și procentajul de spermatozoizi pentru fiecare anomalie identificată;
- perioada până la împerechere, inclusiv numărul de zile până la împerechere;
- durata gestației;
- numărul de implantări, corpuri galbene, dimensiunea cuiburilor;
- numărul de pui născuți vii și pierderi după implantare;
- numărul de pui cu anomalii macroscopice, numărul de pui mai mici decât normal, dacă se determină;
- date privind reperele fizice la pui și alte date privind dezvoltarea postnatală; reperele fizice evaluate se justifică;
- date privind investigațiile funcționale la pui și adulți, după caz;
- prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

## ▼B

Discutarea rezultatelor.

Concluzii, inclusiv valorile NOAEL pentru efectele asupra femelelor gestante și descendenți.

4.

#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
2. Gray, L. E. *et al.*, (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12; 92-108.
3. Robb, G. W. *et al.*, (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54; 103-107.
4. Klinefelter, G. R. *et al.*, (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5; 39-44.
5. Seed, J. *et al.* (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3); 237- 244.
6. Chapin, R. E. *et al.*, (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6; 267-273.
7. Klinefelter, G. R. *et al.*, (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
8. Slott, V. L. *et al.*, (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
9. Slott, V. L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.
10. Toth, G. P. *et al.* (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10:401-415.
11. Working, P. K. and M. Hurtt, (1987). Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
12. Linder, R. E. *et al.*, (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
13. Korenbrot, C. C. *et al.*, (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17; 298-303.
14. Russell, L. D. *et al.*, (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.
15. Heindel, J. J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
16. Heindel, J. J. *et al.*, (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
17. Manson, J. M. and Y. J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

**▼B**

18. Smith, B. J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5; 379-383.
19. Heindel, J. J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C. A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
20. Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C. D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
21. Zenick, H. and E. D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A. W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
22. Palmer, A. K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C. A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
23. Palmer, A. K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J. G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

## ▼ M4

## B.36. TOXICOCINETICĂ

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 417 (2010) a OCDE. Studiile care evaluează toxicocinetica unei substanțe au ca scop să obțină informații adecvate privind absorbția, distribuția, biotransformarea (adică metabolismul) și excreția acesteia, să ajute la stabilirea unei relații între concentrație sau doză și toxicitatea observată și să ajute la înțelegerea mecanismului toxicității. Toxicocinetica poate contribui la înțelegerea studiilor toxicologice prin demonstrarea faptului că animalele utilizate în scopuri experimentale sunt expuse în mod sistematic la substanța chimică testată și prin identificarea fracțiilor circulante (substanță chimică de origine/metaboliți). Parametrii toxicocinetici de bază determinați în urma acestor studii vor furniza, de asemenea, informații privind potențialul de acumulare a substanței chimice testate în țesuturi și/sau organe și potențialul de declanșare a biotransformării ca urmare a expunerii la aceasta.
2. Datele toxicocinetice pot contribui la evaluarea adecvării și relevanței datelor de toxicitate animală în scopul extrapolării pericolelor pentru om și/sau a evaluării riscurilor. În plus, studiile toxicocinetice pot oferi informații utile privind stabilirea nivelurilor dozelor pentru studiile de toxicitate (cinetică liniară și neliniară), efectele asociate căilor de administrare, biodisponibilitatea și aspecte legate de proiectul studiului. Anumite tipuri de date toxicocinetice pot fi utilizate pentru elaborarea de modele toxicocinetice fiziologice.
3. Datele privind metabolismul/toxicocinetica au utilizări importante, cum ar fi sugerarea posibilelor toxicități și a modurilor de acțiune și a relațiilor dintre acestea și nivelul dozei și calea de expunere. În plus, datele privind metabolismul pot oferi informații utile pentru evaluarea importanței toxicologice a expunerilor la metaboliți exogeni ai substanței chimice testate.
4. Datele toxicocinetice adecvate vor fi utile în susținerea suplimentară a acceptabilității și a aplicabilității relațiilor cantitative structură-activitate, a metodelor de extrapolare sau a grupării în evaluarea siguranței substanțelor chimice. Datele cinetice mai pot fi utilizate pentru evaluarea relevanței toxicologice a altor studii (de exemplu, studii *in vivo/in vitro*).
5. Dacă nu sunt menționate alte căi de administrare (a se vedea în special punctele 74-78), această metodă de testare se aplică administrării orale a substanței chimice testate.

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

6. Sistemele de reglementare conțin cerințe și necesități diferite în ceea ce privește măsurarea efectelor și a parametrilor toxicocinetici ai diferitelor clase de substanțe chimice (de exemplu, pesticide, biocide, substanțe chimice industriale). Spre deosebire de majoritatea metodelor de testare, aceasta metodă descrie testarea toxicocinetică, care presupune măsurători și efecte multiple. În viitor pot fi dezvoltate metode de testare și/sau documente de orientare noi pentru a descrie fiecare efect în parte și în detaliu. În cazul acestei metode de testare, testele sau evaluările efectuate sunt specificate de către fiecare dintre cerințele și/sau sistemele de reglementare.

▼ **M4**

7. Există numeroase studii ce pot fi realizate pentru a evalua comportamentul toxicocinetic al unei substanțe chimice testate în scopuri de reglementare. Totuși, în funcție de necesități și de situațiile de reglementare specifice, este posibil să nu fie necesare toate aceste studii pentru evaluarea unei substanțe chimice testate. În proiectarea studiilor toxicocinetice este nevoie de flexibilitate, pentru a se ține cont de caracteristicile substanței chimice testate care face obiectul investigațiilor. În unele cazuri, este necesară numai studierea unui anumit set de elemente pentru abordarea motivelor de îngrijorare privind pericolele și riscurile asociate substanței chimice testate. În unele situații, datele toxicocinetice pot fi colectate ca parte a evaluării din alte studii toxicologice. În alte situații pot fi necesare studii toxicocinetice suplimentare și/sau mai complexe, în funcție de necesitățile de reglementare și/sau dacă apar noi elemente în cursul evaluării substanței chimice testate.
8. Laboratorul de testare ar trebui să țină cont de toate informațiile disponibile referitoare la substanța chimică testată, la metaboliții și la analogii relevanți înainte de efectuarea studiului, în vederea creșterii calității acestuia și pentru a evita utilizarea inutilă a animalelor. Aceste informații ar putea include date obținute prin alte metode de testare relevante (studii *in vivo/in vitro* și/sau evaluări *in silico*). Proprietățile fizico-chimice, cum sunt coeficientul de partiție octanol/apă (exprimat ca log P<sub>OW</sub>), pK<sub>a</sub>, solubilitatea în apă, presiunea de vapori și greutatea moleculară a unei substanțe chimice, pot fi utile în planificarea studiului și interpretarea rezultatelor. Acestea pot fi determinate prin metode adecvate, astfel cum sunt descrise în metodele de testare relevante.

**LIMITĂRI**

9. Această metodă de testare nu poate fi aplicată în situații speciale, cum ar fi la animale gestante sau care alăptează și la pui de animale sau pentru evaluarea eventualelor reziduuri din animalele destinate producției de alimente care au fost expuse. Totuși, datele obținute în urma unui studiu conform capitolului B.36 pot oferi informații de referință, utile în proiectarea unor studii specifice pentru aceste investigații. Această metodă nu este destinată testării nanomaterialelor. Un raport privind revizuirea preliminară a aplicabilității orientărilor OCDE la nanomateriale indică faptul că Orientarea 417 (echivalentă metodei de testare B. 36) nu se aplică acestora (1).

**DEFINIȚII**

10. Definițiile utilizate în scopurile acestei metode de testare sunt furnizate în apendice.

**CONSIDERAȚII REFERITOARE LA BUNĂSTAREA ANIMALELOR**

11. Orientări privind tratamentul uman al animalelor sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 19 (2). Se recomandă consultarea Ghidului OCDE nr. 19 pentru toate studiile *in vivo* și *in vitro* descrise în această metodă de testare.

**DESCRIEREA METODELOR****Studii pilot**

12. Utilizarea studiilor pilot este recomandată și încurajată pentru selectarea parametrilor experimentali ai studiilor de toxicocinetică (de exemplu, metabolism, bilanț masic, proceduri analitice, determinarea dozei, expirația CO<sub>2</sub> etc.). Caracterizarea unora dintre acești parametri poate să nu necesite utilizarea de substanțe chimice marcate radioactiv.

▼ **M4****Selectarea animalelor***Specia*

13. Specia (și sușa) animalelor utilizate pentru testele toxicocinetice ar trebui, de preferință, să fie identice cu cele utilizate în alte studii toxicologice efectuate pe substanța chimică studiată. Animalul recomandat este șobolanul, acesta fiind cel mai frecvent utilizat în studiile toxicologice. Utilizarea altor specii sau a unor specii suplimentare poate fi justificată atunci când studiile toxicologice critice identifică urme importante de toxicitate la astfel de specii sau dacă se constată că toxicitatea/toxicocinetica acestora prezintă o relevanță mai mare pentru om. Selectarea speciei de animale și a sușei acestora ar trebui justificată.
14. Dacă nu se specifică altfel, specia utilizată pentru această metodă de testare este șobolanul. Este posibil ca anumite aspecte ale acestei metode de testare să trebuiască a fi modificate pentru folosirea altor specii utilizate în scopuri experimentale.

*Vârsta și sușa*

15. Ar trebui utilizate animale adulte sănătoase, tinere (de obicei având 6-12 săptămâni la momentul administrării dozei) (a se vedea, de asemenea, punctele 13 și 14). Utilizarea altor animale în afara celor adulte tinere ar trebui să fie justificată. Toate animalele ar trebui să aibă aceeași vârstă la începutul studiului. Diferența de greutate între animale nu ar trebui să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a grupului de test. În mod ideal, sușa utilizată ar trebui să fie identică cu cea utilizată pentru obținerea bazei de date toxicologice privind substanța chimică testată.

*Numărul și sexul animalelor*

16. Pentru fiecare doză testată ar trebui să se utilizeze cel puțin patru animale de același sex. Ar trebui prezentată o justificare pentru sexul animalelor utilizate. Ar trebui avută în vedere utilizarea animalelor de ambele sexe (patru masculi și patru femele) atunci când există indicii privind diferențe semnificative de toxicitate în legătură cu sexul.

*Condiții de adăpostire și de hrănire*

17. În general, animalele ar trebui adăpostite în incinte individuale pe durata perioadei de testare. Adăpostirea în grupuri poate fi justificată doar în cazuri speciale. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Temperatura și umiditatea relativă a sălii în care se află animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de 22 °C ( $\pm 3$  °C), iar umiditatea relativă de 30-70 %. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut.

**Substanța chimică testată**

18. Pentru toate aspectele studiului care se referă la bilanțul masic și la identificarea metaboliților ar trebui utilizată o substanță chimică marcată radioactiv cu  $^{14}\text{C}$ ; totuși, dacă se poate demonstra că:

— bilanțul masic și identificarea metaboliților pot fi evaluate în mod adecvat utilizând o substanță chimică testată nemarcată;

— specificitatea și sensibilitatea analitică a metodei utilizate cu substanța chimică testată nemarcată radioactiv sunt egale sau mai mari decât cele care ar putea fi obținute prin marcarea radioactivă a acesteia,



## ▼M4

atunci nu este necesară utilizarea unei substanțe chimice testate marcate radioactiv. În plus, pot fi utilizați alți izotopi radioactivi și stabili, în special dacă elementul determină toxicitatea sau dacă face parte din porțiunea toxică a substanței chimice testate. Dacă este posibil, marcajul radioactiv ar trebui localizat în porțiunea centrală a moleculei stabile din punct de vedere metabolic (nu poate fi înlocuită, nu este eliminată prin metabolism sub formă de  $\text{CO}_2$  și nu este inclusă ansamblul radicalilor un atom de carbon din organism). Este posibil să fie necesară marcarea mai multor porțiuni sau zone specifice ale moleculei pentru a urmări soarta metabolică a substanței chimice testate.

19. Substanțele testate marcate și nemarcate radioactiv ar trebui să fie analizate folosind metode adecvate de stabilire a purității și identității. Puriitatea radiochimică a substanței chimice testate marcate radioactiv ar trebui să fie cea mai înaltă posibilă pentru o anumită substanță chimică testată (în mod ideal, peste 95 %) și ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru a identifica impuritățile prezente în procent mai mare sau egal cu 2 %. Puriitatea, împreună cu identitatea și proporția impurităților identificate ar trebui să fie raportate. Anumite programe de reglementare pot alege să ofere orientări suplimentare pentru a ajuta la definirea și la specificarea substanțelor testate formate din amestecuri și a metodelor de determinare a purității.

#### Alegerea dozei

##### *Studiul pilot*

20. De obicei, pentru studiul pilot este suficientă o doză orală unică. Doza nu ar trebui să fie toxică, însă ar trebui să fie suficient de mare pentru a permite identificarea metaboliților în excremente (și, după caz, în plasmă) și pentru a atinge obiectivul declarat al studiului pilot, astfel cum se menționează la punctul 12 al acestei metode de testare.

##### *Studiile principale*

21. Numărul preferat de doze pentru studiile principale este de cel puțin două, deoarece informațiile colectate de la cel puțin două grupuri de doză pot fi utile la stabilirea dozelor în alte studii de toxicitate și pentru evaluarea relației doză-răspuns din testele de toxicitate existente.
22. Atunci când se administrează două niveluri de doze, ambele ar trebui să fie suficient de mari pentru a permite identificarea metaboliților în excreții (și, după caz, în plasmă). Stabilirea dozei ar trebui să țină cont de informațiile obținute din datele de toxicitate disponibile. Dacă nu sunt disponibile informații (obținute, de exemplu, din studiile de toxicitate orală acută care înregistrează semnele clinice de toxicitate sau din studiile de toxicitate cu doză repetată), poate fi avută în vedere o valoare pentru doza mai mare situată sub valoarea estimată pentru  $\text{DL}_{50}$  (căile orală și cutanată) sau pentru  $\text{CL}_{50}$  (calea de administrare prin inhalare) sau sub valoarea cea mică estimată pentru intervalul de toxicitate acută. Doza mai mică ar trebui să fie o fracțiune din doza mai mare.
23. Dacă este investigat un singur nivel de doză, aceasta ar trebui să fie, în condiții ideale, suficient de mare pentru a permite identificarea metaboliților în excreții (și, după caz, în plasmă), fără a produce toxicitate vizibilă. Motivul neintroducerii unei a doua doze ar trebui să fie justificat.
24. Dacă este necesară stabilirea efectului dozei asupra proceselor cinetice, este posibil ca două doze să nu fie suficiente și ar trebui ca cel puțin o doză să fie suficient de mare pentru a satura aceste procese. În cazul în care zona de sub curba concentrație plasmatică în funcție de timp (ASC) nu este liniară între cele două niveluri de doză utilizate în studiul principal, acesta este un indiciu clar că între cele două niveluri de doză are loc saturarea a unuia sau mai multor procese cinetice.

▼ **M4**

25. Doza maximă care ar trebui utilizată pentru substanțele chimice testate cu toxicitate redusă este de 1 000 mg/kg greutate corporală (căile orală și cutanată) – dacă administrarea se face prin inhalare, pentru orientare consultați capitolul B.2 din prezenta anexă; în mod normal, această doză nu ar trebui să depășească 2 mg/l. Anumite considerații de specifice substanței chimice pot impune utilizarea unei doze mai mari, în funcție de necesitățile de reglementare. Alegerea dozei ar trebui să fie întotdeauna justificată.
26. Datele toxicocinetice și de distribuție tisulară pentru doza unică pot fi suficiente pentru a determina potențialul de acumulare și/sau de persistență. Totuși, în anumite cazuri, poate fi necesară administrarea de doze repetate: (i) pentru o mai bună identificare a potențialului de acumulare și/sau de persistență sau a modificărilor toxicocinetice (de exemplu, inducția și inhibarea enzimelor); sau (ii) întrucât este impus de sistemul de reglementare în vigoare. În studiile cu doze repetate, deși administrarea dozei mici este, de obicei, suficientă, în anumite circumstanțe poate fi necesară administrarea repetată a unei doze mari (a se vedea, de asemenea, punctul 57).

**Administrarea substanței chimice testate**

27. Substanța chimică testată ar trebui să fie dizolvată sau trecută în suspensie omogenă în același vehicul utilizat pentru celelalte studii de toxicitate cu administrare prin gavaj oral, dacă informațiile privind acest vehicul sunt cunoscute. Alegerea vehiculului ar trebui să fie justificată. Alegerea vehiculului și volumul de dozare ar trebui avute în vedere în proiectul studiului. Metoda cea mai obișnuită de administrare este prin gavaj; cu toate acestea, în anumite situații poate fi utilă administrarea prin capsule din gelatină sau prin amestecarea în hrană (în ambele cazuri, soluția folosită ar trebui justificată). Ar trebui verificată doza efectivă administrată fiecărui animal.
28. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată prin gavaj oral depinde de dimensiunea animalelor utilizate în scopuri experimentale, tipul vehiculului în care este introdusă doza și dacă animalul este hrănit sau nu înainte de administrarea substanței chimice testate. Motivele pentru hrănire sau limitarea acesteia înainte de administrarea dozei ar trebui să fie explicate. În mod normal, volumul ar trebui menținut la un nivel cât mai redus posibil atât pentru vehiculele apoase, cât și pentru cele neapoase. De regulă, volumul dozelor nu ar trebui să depășească 10 ml/kg greutate corporală la rozătoare. Volumele vehiculelor utilizate pentru substanțele chimice testate mai lipofile pot începe de la 4 ml/kg greutate corporală. Atunci când dozele sunt repetate, caz în care privarea zilnică de hrană ar fi contraindicată, ar trebui avute în vedere volume mai mici (de exemplu, 2-4 ml/kg greutate corporală). Dacă este posibil, va fi avută în vedere utilizarea unui volum al dozei în concordanță cu cele utilizate pentru substanța chimică testată în alte studii cu administrare prin gavaj oral.
29. Biodisponibilitatea sau absorbția orală relativă pot fi stabilite cu ajutorul administrării intravenoase (IV) a substanței chimice testate și a măsurării nivelului substanței chimice testate în sânge și/sau în excreții. Pentru studiul IV, se administrează o doză unică (de obicei echivalentă, însă fără a depăși doza orală mai mică – a se vedea selecția dozei) de substanță chimică testată, într-un vehicul adecvat. Acest material ar trebui să fie administrat într-un volum adecvat (de exemplu, 1 ml/kg greutate corporală), la locul selectat pentru administrare, la cel puțin patru animale de sex corespunzător (dacă se justifică, pot fi utilizate ambele sexe, a se vedea punctul 16). Pentru administrarea IV a substanței chimice testate este necesară prepararea unei doze complet dizolvate sau în suspensie. Vehiculul pentru administrarea IV nu ar trebui să interfereze cu integritatea sângelui sau fluxul sanguin. Dacă substanța chimică testată este administrată prin perfuzie, viteza perfuziei ar trebui să fie raportată și standardizată pentru toate animalele, cu condiția utilizării unei pompe de perfuzie. Animalul ar trebui anesteziat atunci când se canulează vena jugulară (pentru administrarea substanței chimice testate și/sau prelevarea de sânge) sau când este

▼ **M4**

utilizată artera femurală pentru administrare. Ar trebui să se acorde atenție tipului de anestezie folosit, deoarece poate avea efecte asupra toxicocineticii. Animalele ar trebui lăsate să își revină la starea normală înainte de administrarea substanței chimice testate și a vehiculului.

30. Pentru anumite substanțe chimice testate pot fi utilizate alte căi de administrare, cum sunt cea cutanată și cea prin inhalare (a se vedea punctele 74-78), în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora și de utilizarea sau expunerea umană preconizată.

**Măsurări***Bilanțul masic*

31. Bilanțul masic se calculează prin însumarea procentului dozei (radioactive) administrate care a fost excretat în urină, fecale și aerul expirat, cu procentul corespunzător prezent în țesuturi, în carcasa rămasă și în reziduurile colectate la spălarea cuștii (a se vedea punctul 46). În general, se consideră adecvată orice recuperare a substanței chimice testate (radioactivitate) administrate în procent de peste 90 %.

*Absorbția*

32. O primă estimare a absorbției poate fi obținută prin scăderea din valoarea bilanțului masic a procentului dozei prezente în tractul gastrointestinal (GI) și/sau în fecale. Pentru calculul procentului de absorbție, a se vedea punctul 33. Pentru investigarea excrețiilor, a se vedea punctele 44-49. Dacă gradul de absorbție după administrarea dozei orale nu poate fi calculat cu precizie pe baza studiilor de bilanț masic (de exemplu, atunci când în fecale este prezentă peste 20 % din doza administrată), pot fi necesare investigații suplimentare. Aceste studii ar putea include: 1. administrarea orală a substanței chimice testate și măsurarea substanței chimice testate în bilă; sau 2. administrarea orală și IV a substanței chimice testate și măsurarea substanței chimice testate nete prezente în urină, aerul expirat și carcasa pentru fiecare din cele două căi de administrare. În oricare dintre proiectele studiilor, radioactivitatea se măsoară ca metodă alternativă pentru analiza chimică specifică a substanței chimice testate și a metaboliților.
33. În cazul în care se efectuează un studiu al excreției biliare, calea de administrare cel mai frecvent utilizată este cea orală. În acest studiu, substanța chimică testată se administrează într-o doză unică, prin canularea căilor biliare la cel puțin patru animale de sex corespunzător (sau de ambele sexe, dacă se justifică). După administrarea substanței chimice testate, excreția radioactivității/substanței chimice testate în bilă ar trebui urmărită atât timp cât este necesar pentru a estima procentul din doza administrată care a fost excretat pe această cale, care poate fi utilizat apoi pentru a calcula în mod direct gradul de absorbție orală, după cum urmează:

$$\text{Procentul de absorbție} = \frac{(\text{cantitatea din bilă} + \text{urină} + \text{aerul expirat} + \text{carcasă fără conținutul din tractul GI}) / \text{cantitatea administrată} \times 100.$$

34. La unele clase de substanțe chimice testate, secreția directă a dozei absorbite poate avea loc prin membranele intestinale. În astfel de cazuri, măsurarea procentului dozei în fecale după administrarea unei doze orale la șobolanul cu căile biliare canulate nu este considerată reprezentativă pentru doza neabsorbită. În cazul în care se presupune că are loc o secreție intestinală, se recomandă ca procentul dozei absorbite să se bazeze pe absorbția calculată prin compararea excreției după administrare pe cale orală și cea pe cale IV (la șobolanul cu și fără căile biliare canulate) (a se vedea punctul 35). Dacă se consideră necesară cuantificarea secreției intestinale, se recomandă, de asemenea, măsurarea excreției după administrarea dozei IV la șobolanul cu căile biliare canulate.

▼ **M4***Biodisponibilitatea*

35. Biodisponibilitatea poate fi calculată pe baza cineticii plasmatice/sangvine la grupurile cu administrare orală și IV descrise la punctele 50-52, prin analiza chimică specifică a substanței chimice testate și/sau a metabolitului (metaboliților) relevant (relevanți), prin urmare nefiind necesară marcarea radioactivă a substanței chimice testate. Biodisponibilitatea (F) substanței chimice testate sau a metabolitului (metaboliților) relevant (relevanți) poate fi calculată după cum urmează:

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

unde ASC este zona de sub curba concentrației plasmatice în funcție de timp, iar exp este calea de administrare experimentală (orală, cutanată sau prin inhalare).

36. Pentru evaluarea riscurilor efectelor sistemice, biodisponibilitatea componentei toxice este în general preferată procentului de absorbție atunci când concentrațiile sistemice ale studiilor la animale sunt comparate cu datele analoge de biomonitorizare ale studiilor privind expunerea muncitorilor. Situația poate deveni mai complicată atunci când dozele se află în intervalul neliniar, astfel încât este important ca procedura de screening toxicocinetic să determine dozele din intervalul liniar.

*Distribuția tisulară*

37. Cunoașterea distribuției tisulare a unei substanțe chimice testate și/sau a metaboliților acesteia este importantă atât pentru identificarea țesuturilor țintă și înțelegerea mecanismelor de toxicitate subiacente, cât și pentru obținerea de informații privind potențialul de acumulare și de persistență al substanței chimice testate și al metaboliților. Procentul dozei totale (radioactive) din țesuturi și din carcasa reziduală ar trebui să fie măsurat cel puțin la încheierea experimentului de excreție (de obicei, într-un interval de cel mult 7 zile după administrarea dozei, în funcție de comportamentul specific al substanței chimice testate). Dacă la încheierea studiului nu este detectată nicio urmă a substanței chimice testate în țesuturi (de exemplu, deoarece substanța chimică testată a fost eliminată înainte de încheierea studiului ca urmare a unui timp scurt de înjumătățire), ar trebui să se acorde atenție evitării erorilor de interpretare a datelor. Într-o astfel de situație, distribuția tisulară ar trebui investigată la momentul concentrației plasmatice/sangvine maxime ( $T_{\text{max}}$ ) a substanței chimice testate (și/sau a metaboliților) sau la rata maximă a excreției urinare, după caz (a se vedea punctul 38). În plus, prelevarea de țesuturi poate fi necesară și la alte momente, pentru a se determina distribuția tisulară a substanței chimice testate și/sau a metaboliților săi, pentru a evalua dependența de timp (dacă este necesar), pentru a ajuta la calculul bilanțului masic și/sau la solicitarea unei autorități competente. Țesuturile care ar trebui prelevate includ țesuturi hepatice, adipoase, de la nivelul tractului GI, renale sau splenice, sânge integral, țesuturi din carcasa reziduală, din organele țintă și orice alte țesuturi [de exemplu, din glanda tiroidă, eritrocite, din organele reproductive, piele, din ochi (în special la animalele pigmentate)] care pot prezenta interes în evaluarea toxicologică a substanței chimice testate. Ar trebui avută în vedere analiza țesuturilor suplimentare la aceleași momente, în scopul unei utilizări mai eficiente a animalelor și în cazul în care se observă toxicitate la organul țintă în cursul studiilor de toxicitate cronică sau subcronică. De asemenea, ar trebui raportate concentrația reziduurilor (radioactive) și rapoartele țesut-plasmă (sangvină).
38. De asemenea, ar putea fi necesară sau solicitată de o autoritate competentă, evaluarea distribuției tisulare la momente precum cel al concentrației plasmatice/sangvine maxime ( $T_{\text{max}}$ ) sau al ratei maxime de excreție urinară, obținute în urma studiilor de cinetică plasmatică/sangvină sau de excreție respective. Aceste informații pot fi utile pentru înțelegerea toxicității și a potențialului de acumulare și de persistență al substanței chimice testate și al metaboliților. Selecția probelor ar trebui justificată; în general, probele pentru analiză ar trebui să îndeplinească aceleași condiții ca mai sus (a se vedea punctul 37).

▼ **M4**

39. Cuantificarea radioactivității pentru studiile privind distribuția tisulară poate fi efectuată prin disecarea, omogenizarea, combustia și/sau solubilizarea organelor, urmată de numărarea în scintilație lichidă (LSC) a reziduurilor capturate. Anumite tehnici, aflate în prezent în diferite stadii de evoluție, cum sunt autoradiografierea cantitativă a întregului organism și autoradiografierea microscopică a receptorilor, se pot dovedi utile pentru determinarea distribuției unei substanțe chimice testate în organe și/sau țesuturi (3) (4).
40. Pentru alte căi de expunere decât cea orală, ar trebui prelevate și analizate țesuturi specifice, precum cele pulmonare, în cazul studiilor de toxicitate prin inhalare, sau piele, în cazul studiilor de toxicitate cutanată. A se vedea punctele 74-78.

*Metabolismul*

41. Excrețiile (și, după caz, plasma) ar trebui să fie colectate pentru identificarea și cuantificarea substanței chimice testate și a metaboliților nemodificați, în conformitate cu descrierea de la punctele 44-49. Se acceptă gruparea excrețiilor pentru a facilita identificarea metaboliților unui anumit grup tratat. Se recomandă stabilirea profilurilor metaboliților pentru fiecare perioadă. Totuși, dacă lipsa de probe și/sau marcare radioactivă împiedică aceasta, se acceptă gruparea urinei și fecalelor de la mai multe momente, dar nu se acceptă gruparea celor provenite de la sexe sau doze diferite. Urina, fecalele, radioactivitatea din expirația animalelor tratate și bila, după caz, ar trebui evaluate prin metode calitate și cantitative adecvate.
42. Ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru a se identifica toți metaboliții prezenți în procent de minimum 5 % din doza administrată și pentru a se alcătui o schemă metabolică pentru substanța chimică testată. Substanțele testate care au fost caracterizate în excreții ca reprezentând cel puțin 5 % din doza administrată ar trebui identificate. Această identificare constă în determinarea structurii exacte a componentelor. De obicei, identificarea este efectuată fie prin co-cromatografia metabolitului împreună cu etaloane cunoscute, folosind două sisteme diferite, sau prin tehnici de identificare structurală pozitivă, cum sunt spectrometria de masă, rezonanța magnetică nucleară (RMN) etc. În cazul co-cromatografiei, tehnicile cromatografice care utilizează aceeași fază staționară cu două sisteme de solvenți diferite nu sunt considerate ca fiind o metodă adecvată de dublă verificare a identității metabolitului, deoarece metodele nu sunt independente. Identificarea prin co-cromatografie ar trebui să fie obținută prin folosirea a două sisteme diferite și independente din punct de vedere analitic, precum cromatografia în strat subțire (CSS), cu fază inversă și cu fază normală, și cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). Dacă separarea cromatografică este de calitate adecvată, confirmarea suplimentară prin mijloace spectroscopice nu este necesară. Alternativ, identificarea clară mai poate fi obținută utilizând metode care furnizează informații structurale cum sunt: cromatografia de lichide/spectrometria de masă (LC-MS), cromatografia de lichide/spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS), cromatografia de gaze/spectrometria de masă (GC-MS) și spectrometria RMN.
43. Dacă identificarea metaboliților în procent de minimum 5 % din doza administrată nu este posibilă, această situație ar trebui justificată/explicată în raportul final. Identificarea metaboliților care reprezintă sub 5 % din doza administrată poate fi utilă pentru o mai bună înțelegere a căii metabolice, pentru evaluarea pericolelor și/sau a riscurilor asociate substanței chimice testate. Ar trebui să se furnizeze o confirmare structurală ori de câte ori acest lucru este posibil. Aceasta poate include stabilirea profilului în plasmă, sânge sau alte țesuturi.

▼ **M4***Excreția*

44. Rata și gradul de excreție a dozei administrate ar trebui să fie determinate prin măsurarea procentului dozei (radioactive) recuperate din urină, fecale și aerul expirat. Aceste date vor ajuta și la calcularea bilanțului masic. Cantitățile de substanță chimică testată (radioactivitate) care au fost eliminate prin urină, fecale și aerul expirat ar trebui să fie determinate la intervale adecvate de timp (a se vedea punctele 47-49). Experimentele cu doză repetată ar trebui să fie proiectate în mod corespunzător, astfel încât să permită colectarea datelor de excreție pentru atingerea obiectivelor descrise la punctul 26. Aceasta va permite realizarea unei comparații cu studiile în care se administrează o doză unică.
45. Dacă un studiu pilot a demonstrat că în aerul expirat nu a fost excretată nicio cantitate semnificativă din substanța chimică testată (radioactivitate) (conform punctului 49), aerul expirat nu ar trebui să fie colectat în studiul definitiv.
46. Fiecare animal ar trebui să fie plasat într-o unitate metabolică separată pentru colectarea excrețiilor (urină, fecale și aer expirat). La sfârșitul fiecărei perioade de prelevare (a se vedea punctele 47-49), unitățile metabolice se curăță cu un solvent adecvat (procedură denumită „spălarea cuștii”), care permite recuperarea cu maximă eficiență a substanței chimice testate (radioactivitate). Prelevarea excrețiilor ar trebui să înceteze după 7 zile sau, în caz contrar, după recuperarea a cel puțin 90 % din doza administrată.
47. Cantitățile totale de substanță chimică testată (radioactivitate) din urină ar trebui să se determine de cel puțin două ori în prima zi de prelevare, una dintre acestea ar trebui să aibă loc la 24 de ore după administrarea dozei, iar apoi zilnic, până la încheierea studiului. Se recomandă prelevarea de probe la mai mult de două momente în prima zi (de exemplu, la 6, 12 și 24 de ore). Rezultatele studiilor pilot ar trebui analizate pentru obținerea de informații privind momente alternative sau suplimentare de prelevare. Graficele de prelevare utilizate ar trebui justificate.
48. Cantitățile totale de substanță chimică testată (radioactivitate) din fecale ar trebui să se determine zilnic, începând cu 24 de ore de la prima administrare a dozei și până la încheierea studiului, cu excepția cazului în care studiile pilot sugerează momente alternative sau suplimentare de prelevare. Graficele alternative de prelevare utilizate ar trebui justificate.
49. Prelevarea CO<sub>2</sub> expirat și a altor materiale volatile poate fi întreruptă în cursul unui studiu experimental în cazul în care în aerul expirat se determină mai puțin de 1 % din doza administrată într-un interval de prelevare de 24 de ore.

**Studii privind evoluția în timp***Cinetica plasmatică/sangvină*

50. Scopul acestor studii este de a obține estimări ale parametrilor toxicocinetici de bază [de exemplu,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , timp de înjumătățire ( $t_{1/2}$ ), ASC] ai substanței chimice testate. Aceste studii pot fi efectuate la o doză unică sau, mai probabil, la cel puțin două doze. Nivelul dozei ar trebui să fie stabilit în funcție de natura experimentului și/sau problema studiată. Datele cinetice pot fi necesare pentru identificarea unor aspecte precum biodisponibilitatea substanței chimice testate și/sau pentru a clarifica efectul dozei asupra eliminării (de exemplu, pentru a clarifica dacă saturarea eliminării depinde de doză).
51. Pentru aceste studii ar trebui utilizate cel puțin patru animale de același sex în fiecare grup de doză. Ar trebui prezentată o justificare pentru sexul animalelor utilizate. Ar trebui avută în vedere utilizarea animalelor de ambele sexe (patru masculi și patru femele) atunci când există indicii privind diferențe semnificative de toxicitate în legătură cu sexul.

▼ **M4**

52. După ce substanța chimică testată (marcată radioactiv) a fost administrată, ar trebui prelevate probe de sânge de la fiecare animal, la intervale adecvate, folosind metodologia corespunzătoare de prelevare. Volumul și numărul probelor de sânge care pot fi prelevate de la fiecare animal pot fi limitate de eventualele efecte ale prelevării repetate asupra sănătății/fiziologiei animalelor și/sau asupra sensibilității metodei analitice. Se analizează toate probele de la fiecare animal. În unele cazuri (de exemplu, caracterizarea metaboliților), poate fi necesară gruparea probelor de la mai multe animale. Probele grupate ar trebui să fie identificate în mod clar și să fie însoțite de o justificare a grupării. Dacă se utilizează o substanță marcată radioactiv, poate fi necesară analizarea radioactivității prezente totale. În acest caz, radioactivitatea totală ar trebui analizată fie în sângele integral și în plasmă, fie în plasmă și în globulele roșii pentru a permite calcularea raportului sânge/plasmă. În alte cazuri, pot fi necesare investigații mai specifice care necesită identificarea compusului de origine și/sau a metaboliților sau evaluarea legării de proteine.

*Cinetica altor țesuturi*

53. Scopul acestor studii este de a obține informații privind evoluția în timp, pentru analizarea unor aspecte precum modul de acțiune toxică, bioacumularea și biopersistența prin determinarea nivelurilor substanței chimice testate în diverse țesuturi. Selecția țesuturilor și a numărului de momente evaluate va depinde de aspectul vizat și de baza de date toxicologică referitoare la substanța chimică testată. Proiectarea acestor studii suplimentare de cinetică a țesuturilor ar trebui să țină seamă de informațiile obținute în conformitate descrierea de la punctele 37-40. Aceste studii pot implica administrarea unei doze unice sau a unor doze repetate. Fiecare abordare ar trebui justificată în detaliu.
54. Motivele pentru efectuarea unor studii privind cinetica altor țesuturi pot include:
- identificarea unui timp de înjumătățire în sânge extins, care sugerează o posibilă acumulare a substanței chimice în diferite țesuturi; sau
  - interesul de a vedea dacă s-a atins o stare staționară în anumite țesuturi (de exemplu, în cadrul studiilor cu doză repetată, chiar dacă a fost obținut un nivel aparent staționar al substanței chimice testate în sânge, poate fi de interes să se stabilească dacă a fost obținut un nivel staționar și în țesuturile țintă).

55. Pentru aceste tipuri de studii privind evoluția în timp se administrează o doză orală corespunzătoare din substanța chimică testată la cel puțin patru animale, la fiecare interval de administrare, și se urmărește evoluția în timp a distribuției în țesuturile relevante. Pot fi utilizate numai animale de același sex, cu excepția cazurilor în care se observă o toxicitate specifică unui anumit sex. Analiza radioactivității totale sau a substanței chimice de origine și/sau a metaboliților va depinde, de asemenea, de problema studiată. Evaluarea distribuției tisulare ar trebui realizată folosind tehnici adecvate.

*Inducția/inhibarea enzimatică*

56. Studiile care abordează posibilele efecte ale inducției/inhibării enzimactice sau biotransformării substanței studiate pot fi necesare în unul sau mai multe din cazurile următoare:
1. dovezile disponibile indică o legătură între biotransformarea substanței chimice testate și creșterea toxicității;
  2. datele de toxicitate disponibile indică o legătură neliniară între doză și metabolism;



## ▼M4

3. rezultatele studiilor de identificare a metaboliților demonstrează existența unui metabolit cu potențial toxic care ar fi putut să fie produs pe o cale enzimatică indusă de substanța chimică testată;
  4. pentru explicarea efectelor posibil legate de fenomenele de inducție a enzimelor;
  5. dacă în cursul experimentelor *in vitro* sau *in vivo* cu specii sau în condiții diferite se observă modificări toxicologice semnificative ale profilului metabolic al substanței chimice testate, poate fi necesară caracterizarea enzimei (enzimelor) implicate (de exemplu, enzimele de fază I, cum sunt izoenzimele sistemului mono-oxigenază dependent de citocromul P450, enzimele de fază II, cum sunt izoenzimele sulfotransferazei sau uridin-difosfat-glucuronil transferazei sau orice alte enzime relevante). Aceste informații pot fi utilizate pentru a evalua relevanța extrapolarilor inter-specii.
57. Ar trebui utilizate protocoale de studiu adecvate pentru evaluarea modificărilor în toxicocinetica substanței chimice testate, validate și justificate corespunzător. Astfel de proiecte de studiu pot consta în administrarea de doze repetate cu substanță chimică testată nemarcată, urmate de administrarea unei doze unice marcate radioactiv în ziua a 14-a sau a unei doze repetate cu substanța chimică testată marcată radioactiv și de prelevarea de probe în zilele 1, 7 și 14, pentru determinarea profilurilor metaboliților. Administrarea de doze repetate cu substanța chimică testată marcată radioactiv poate oferi, de asemenea, informații privind bioacumularea (a se vedea punctul 26).

## ALTE ABORDĂRI

58. Pe lângă experimentele *in vivo* descrise în această metodă de testare, alte abordări pot oferi informații utile privind absorbția, distribuția, metabolizarea sau eliminarea unei substanțe chimice testate la anumite specii.

Utilizarea informațiilor obținute din experimentele *in vitro*

59. Studiile *in vitro* care folosesc sisteme de testare adecvate pot răspunde la mai multe întrebări privind metabolizarea substanței chimice testate. Posibili metaboliți pot fi studiați cu ajutorul hepatocitelor recent izolate sau cultivate și a fracțiilor subcelulare hepatice (de exemplu, microzomi și citozol sau fracția S9). Metabolizarea locală în organul țintă (de exemplu, plămân) poate prezenta interes pentru evaluarea riscurilor. În aceste scopuri pot fi utile fracțiile microzomiale ale organelor țintă. Studiile cu microzomi pot fi utile în abordarea posibilelor diferențe între sexe și stadii de viață și în caracterizarea parametrilor enzimatici ( $K_m$  și  $V_{max}$ ), care pot ajuta la evaluarea dependenței de doză a metabolismului în raport cu nivelurile de expunere. În plus, microzomii pot fi utili pentru identificarea enzimelor microzomiale specifice implicate în metabolizarea substanței chimice testate, care se pot dovedi utile pentru extrapolarea între specii (a se vedea, de asemenea, punctul 56). Potențialul de inducție al biotransformării mai poate fi examinat folosind fracțiile subcelulare hepatice (de exemplu, microzomi și citozol) ale animalelor pretratate cu substanța chimică testată de interes, prin intermediul studiilor *in vitro* de inducție a hepatocitelor sau pe baza unor linii de celule specifice care produc enzimele relevante. În anumite circumstanțe și în condiții adecvate, poate fi avută în vedere utilizarea fracțiilor subcelulare provenite din țesuturi umane pentru determinarea posibilelor diferențe de biotransformare dintre specii. Rezultatele investigațiilor *in vitro* pot fi utilizate, de asemenea, în dezvoltarea modelelor PBTK (5).



▼ **M4**

60. Studiile de absorbție cutanată *in vitro* pot oferi informații suplimentare pentru caracterizarea absorbției (6).
61. Culturile primare de celule pe bază de celule hepatice și secțiuni de țesuturi recente pot fi utilizate în abordarea unor probleme similare celor din cazul microzomilor hepatici. În anumite cazuri, este posibil să se răspundă la anumite întrebări prin utilizarea liniilor celulare care exprimă clar enzima relevantă sau a liniilor celulare modificate genetic. În anumite cazuri, se poate dovedi utilă studierea inhibării și a inducției izoenzimelor specifice citocromului P450 (de exemplu, CYP1A1, 2E1, 1A2 și altele) și/sau a enzimelor de fază II de către compusul de origine, folosind studii *in vitro*. Informațiile obținute pot fi relevante pentru compuși cu structuri similare.

**Utilizarea datelor toxicocinetice din studiile de toxicitate ca informații complementare**

62. Analiza probelor de sânge, țesuturi și/sau excreții obținute în cursul studiilor de toxicitate pot oferi date privind biodisponibilitatea, modificările concentrației plasmatice în timp (ASC,  $C_{max}$ ), potențialul de bioacumulare, ratele de eliminare și modificările de metabolizare și cinetică în funcție de sex și vârstă.
63. Proiectul studiului poate fi utilizat pentru a răspunde la întrebări privind: saturația absorbției, căile de biotransformare sau de excreție la niveluri mai mari ale dozei; funcționarea noilor căi de metabolizare la doze mai mari și limitarea metabolizilor toxici la doze mai mari.
64. Alte considerații privind evaluarea pericolelor ar putea include aspecte precum:
- sensibilitatea în funcție de vârstă datorită diferențelor privind starea barierei hematoencefalice, a rinichilor și/sau a capacităților de detoxifiere;
  - sensibilitatea sub-populației ca urmare a diferențelor între capacitățile de biotransformare sau a altor diferențe toxicocinetice;
  - gradul de expunere al fătului prin transferul transplacental al substanțelor chimice sau al puilor nou-născuți prin alăptare.

**Utilizarea modelării toxicocinetice**

65. Modelele toxicocinetice se pot dovedi utile în diferite aspecte ale evaluării pericolelor și riscurilor, cum ar fi, de exemplu, predicția expunerii sistemice și a dozei transferate țesuturilor interne. În plus, pot fi elucidate probleme specifice privind modul de acțiune, iar modelele pot oferi o bază de extrapolare între specii, căi de expunere, modele de dozare și pentru evaluarea riscurilor la om. Indiferent de specie, datele utile pentru dezvoltarea modelelor PBTK ale unei substanțe chimice testate includ: 1. coeficienți de partiție; 2. constante biochimice și parametri fiziologici; 3. parametri de absorbție specifici căilor; și 4. date cinetice *in vivo* pentru evaluarea modelelor [de exemplu, parametrii de eliminare pentru căile de excreție relevante ( $> 10\%$ ),  $K_m$  și  $V_{max}$  pentru metabolism]. Datele experimentale utilizate pentru dezvoltarea modelelor ar trebui să fie generate prin metode științifice valabile, iar rezultatele modelului ar trebui să fie validate. Parametrii specifici substanței chimice testate și speciilor, precum ratele de absorbție, coeficientul de partiție sânge-țesut și constantele ratei de metabolizare sunt adeseori determinate pentru a facilita dezvoltarea de modele necompartimentate sau fiziologice (7).

**▼ M4****DATE ȘI RAPORT**

66. Se recomandă ca raportul studiului să conțină un cuprins.

**Conținutul raportului**

67. Conținutul raportului ar trebui să includă informații tratate de această metodă de testare, organizate în secțiuni și puncte, după cum urmează:

*Rezumat*

68. Această secțiune a raportului studiului ar trebui să conțină un rezumat al proiectului studiului și o descriere a metodelor utilizate. De asemenea, acesta ar trebui să evidențieze rezultatele cheie privind bilanțul masic, natura și magnitudinea metaboliților, reziduurile din țesuturi, rata de eliminare, potențialul de bioacumulare, diferențele între sexe etc. Rezumatul ar trebui să fie suficient de detaliat pentru a permite evaluarea rezultatelor.

*Introducere*

69. Această secțiune a raportului ar trebui să includă obiectivele, justificarea și proiectul studiului, precum și referințele bibliografice corespunzătoare și eventualul context al acestuia.

*Materiale și metode*

70. Această secțiune a raportului ar trebui să includă o descriere detaliată a tuturor informațiilor pertinente, inclusiv:

## (a) substanța chimică testată

Această subsecțiune ar trebui să includă identificarea substanței chimice testate: denumirea chimică, structura moleculară, determinarea calitativă și cantitativă a compoziției chimice, puritatea chimică și, atunci când este posibil, tipul și cantitățile impurităților. De asemenea, aceasta ar trebui să includă informații referitoare la proprietățile fizico-chimice, inclusiv starea fizică, culoarea, solubilitatea brută și/sau coeficientul de partiție, stabilitatea și, după caz, corozivitatea. Dacă este necesar, ar trebui furnizate informații privind izomerii. În cazul în care substanța chimică testată este marcată radioactiv, în această subsecțiune ar trebui introduse informații referitoare la: tipul de radionuclid, poziția marcajului, activitatea specifică și puritatea radiochimică.

Ar trebui indicate tipul sau descrierea oricăror vehicule, diluanți, agenți de suspensie și emulgatori, precum și orice alte materiale utilizate pentru administrarea substanței chimice testate;

## (b) animalele utilizate în scopuri experimentale

Această subsecțiune ar trebui să conțină informații privind animalele utilizate în scopuri experimentale, inclusiv selectarea și justificarea speciei, sușei și a vârstei la începerea studiului, sexul, greutatea corporală, starea de sănătate și condițiile de creștere a animalului;

## (c) metodele

Această subsecțiune ar trebui să includă detalii privind proiectul studiului și metodologia utilizată. Aceasta ar trebui să conțină o descriere referitoare la:

1. justificarea oricărei modificări a căii și a condițiilor de expunere, după caz;

▼ **M4**

2. justificarea selectării nivelurilor dozei;
3. descrierea studiilor pilot utilizate în proiectarea experimentală a studiilor de urmărire, după caz. Ar trebui prezentate datele de susținere din studiul pilot;
4. modul de preparare a soluției de dozare și tipul eventualului solvent sau vehicul utilizat;
5. numărul grupurilor de tratament și numărul animalelor din fiecare grup;
6. nivelul și volumul dozelor (și, în cazul utilizării radioactivității, activitatea specifică a dozei);
7. calea (căile) și metodele de administrare;
8. frecvența de administrare a dozelor;
9. perioadele de privare de hrană (dacă se utilizează);
10. radioactivitatea totală a fiecărui animal;
11. manipularea animalelor;
12. prelevarea și manipularea probelor;
13. metodele analitice utilizate pentru separarea, cuantificarea și identificarea metaboliților;
14. limita de detecție pentru metodele utilizate;
15. alte măsurători și proceduri experimentale utilizate (inclusiv validarea metodelor de analiză a metaboliților);

## (d) analiza statistică

Dacă rezultatele studiului sunt examinate folosind analiza statistică, ar trebui să fie incluse informații suficiente privind metoda de analiză și programul informatic utilizate, astfel încât un auditor/statistician independent să poată reevalua și reface analiza.

În cazul studiilor de modelare a sistemelor, precum PBTK, modelul ar trebui să fie prezentat suficient de detaliat pentru a permite reconstrucția și validarea independentă a modelului (a se vedea punctul 65 și apendicele „Definiții”).

*Rezultate*

71. Toate datele ar trebui să fie prezentate sub formă de rezumat și tabelar, însoțite de evaluarea statistică adecvată și descrise în textul acestei secțiuni. Datele de contorizare a radioactivității ar trebui să fie rezumate și prezentate în forma corespunzătoare pentru studiu, de obicei în echivalenți microgram sau miligram pe masa de probă, dar pot fi utilizate și alte unități. Această secțiune ar trebui să includă ilustrări grafice ale rezultatelor, reproducerea datelor cromatografice și spectrometrice reprezentative, identificarea/cuantificarea metaboliților și căile metabolice propuse, inclusiv structura moleculară a metaboliților. În plus, în această secțiune vor fi introduse, după caz, următoarele informații:
  1. cantitatea și procentul recuperare a radioactivității din urină, fecale, aerul expirat și din reziduurile de urină și fecale colectate la spălarea cuștii:
    - pentru studiile cutanate vor mai fi incluse, de asemenea, date privind substanța chimică testată recuperată din pielea tratată, spălările pielii, radioactivitatea reziduală din dispozitivul care acoperă pielea și din unitatea metabolică, precum și rezultatele studiului de spălare a substanței de pe piele. Pentru discuții suplimentare, a se vedea punctele 74-77;

**▼ M4**

- pentru studiile prin inhalare vor mai fi incluse, de asemenea, date privind recuperarea substanței chimice testate din plămâni și țesuturile nazale (8). Pentru discuții suplimentare, a se vedea punctul 78;
- 2. distribuția tisulară, raportată ca procent din doza și din concentrația administrată (echivalent micrograme pe gram de țesut) și rapoartele țesut-sânge sau țesut-plasmă;
- 3. bilanțul de materiale rezultat din fiecare studiu presupunând analizarea țesuturilor corporale și a excrețiilor;
- 4. concentrațiile plasmatice și parametrii toxicocinetici (biodisponibilitate, ASC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, eliminare, timp de înjumătățire) după administrarea pe calea (căile) relevantă (relevante) de expunere;
- 5. rata și nivelul de absorbție a substanței chimice testate după administrarea pe calea (căile) relevantă (relevante) de expunere;
- 6. cantitățile de substanță chimică testată și de metaboliți (raportate ca procent din doza administrată) prelevate din excreții;
- 7. o trimitere la datele anexate care conțin date pentru fiecare animal pentru toate efectele măsurate (de exemplu, administrarea dozei, procentul de substanță recuperată, concentrațiile, parametrii toxicocinetici etc.);
- 8. o figură conținând căile metabolice propuse și structurile moleculare ale metaboliților.

*Discuție și concluzii*

72. În această secțiune, autorul (autorii) ar trebui:
  1. să propună o cale metabolică pe baza rezultatelor metabolizării și a eliminării substanței chimice testate;
  2. să discute orice posibilă diferență între specii și sexe privind eliminarea și/sau biotransformarea substanței chimice testate;
  3. să prezinte în formă tabelară și să discute identificarea și amploarea metaboliților, ratele de eliminare, potențialul de bioacumulare și nivelul reziduurilor în țesuturi al substanței de origine și/sau a metaboliților, precum și posibilele modificări ale parametrilor toxicocinetici în funcție de variația dozei, după caz;
  4. să introducă în această secțiune orice date toxicocinetice relevante obținute în cursul studiilor de toxicitate;
  5. să prezinte o concluzie concisă care poate fi susținută de rezultatele studiului;
  6. să adauge secțiuni (după caz sau dacă este necesar).
73. Ar trebui utilizate secțiuni suplimentare care să conțină informații bibliografice, tabele, figuri, appendice etc.

## ▼M4

## CĂI ALTERNATIVE DE EXPUNERE

**Calea cutanată***Tratament cutanat*

74. Această secțiune oferă informații specifice privind investigarea toxicocineticii substanței chimice testate administrate pe cale cutanată. Pentru absorbția cutanată, ar trebui consultat capitolul B.44 din prezenta anexă [Absorbția cutanată: metoda de testare *in vivo* (9)]. Prezenta metodă de testare B.36 poate fi utilizată și pentru alte puncte finale, cum sunt distribuția și metabolismul. În tratamentul cutanat ar trebui folosite unul sau mai multe niveluri ale dozei de substanță chimică testată. Substanța chimică testată (de exemplu materialul pur, diluat sau amestec care conține substanța chimică testată aplicată pe piele) ar trebui să fie același (sau un înlocuitor adecvat) cu preparatul la care pot fi expuși omul sau alte specii țintă posibile. Nivelul (nivelurile) dozei ar trebui selectate în conformitate cu punctele 20-26 din această metodă de testare. Factorii care pot fi luați în considerare în stabilirea dozei cutanate sunt expunerea preconizată la om și/sau dozele la care au fost observate efecte toxice în alte studii de toxicitate cutanată. Dacă este necesar, doza (dozele) cutanată (cutanate) ar trebui să fie dizolvate într-un vehicul adecvat și aplicate într-un volum suficient pentru administrare. Cu puțin timp înainte de testare, blana din regiunea dorsală a animalelor ar trebui tunsă. Blana poate fi și rasă, dar o astfel de operațiune ar trebui efectuată cu aproximativ 24 de ore înainte de test. Când se tunde sau se rade blana ar trebui acordată atenție pentru a nu se leza pielea, acest lucru putându-i afecta permeabilitatea. Zona care se degajează în vederea aplicării substanței chimice testate ar trebui să fie de aproximativ 10 % din suprafața corporală. În cazul substanțelor foarte toxice, suprafața tratată poate fi mai mică de 10 %, însă substanța ar trebui să fie aplicată într-un strat cât mai subțire și mai uniform posibil pe o parte cât mai mare posibil din această suprafață. Aceeași suprafață de tratare ar trebui să fie utilizată la toate grupurile de testare cutanată. Zonele tratate ar trebui să fie protejate prin acoperire permanentă cu un material adecvat, fixat pe suprafață. Animalele ar trebui să fie adăpostite în incinte individuale.
75. Ar trebui efectuat un studiu de spălare cutanată, pentru a evalua cantitatea de doză de substanță chimică testată aplicată care poate fi îndepărtată prin spălare cu un săpun neutru și apă a zonei de piele tratate. Acest studiu poate, de asemenea, să ajute la stabilirea bilanțului masic atunci când substanța chimică testată se administrează pe cale cutanată. Pentru acest studiu de spălare cutanată ar trebui aplicată o doză unică de substanță chimică testată pe două animale. Nivelul dozei este stabilit în conformitate cu punctul 23 al acestei metode de testare (a se vedea, de asemenea, discuția privind perioada de contact cu pielea de la punctul 76). Pentru a evalua eficiența îndepărtării substanței chimice testate prin procedura de spălare ar trebui să se determine cantitatea de substanță chimică testată care a fost recuperată din reziduurile de spălare.
76. Cu excepția cazurilor în care apare corozivitate, substanța chimică testată ar trebui aplicată și păstrată pe piele timp de cel puțin 6 ore. După înlăturarea materialului protector, zona tratată ar trebui spălată conform procedurii prevăzute de studiul de spălare cutanată (a se vedea punctul 75). Atât materialul protector cât și reziduurile de spălare ar trebui analizate pentru identificarea reziduurilor substanței chimice testate. La încheierea studiilor, fiecare animal ar trebui eutanasiat în conformitate cu punctul 2, iar pielea tratată ar trebui eliminată. O porțiune adecvată din pielea tratată ar trebui analizată pentru identificarea reziduurilor de substanță chimică testată (radioactivitate).
77. Pentru evaluarea toxicocineticii a produselor farmaceutice pot fi necesare proceduri diferite, în conformitate cu prevederile sistemului de reglementare relevant.

▼ **M4****Inhalare**

78. Ar trebui utilizată o singură concentrație (sau mai multe, dacă este necesar) a substanței chimice testate. Concentrația (concentrațiile) ar trebui selectate în conformitate cu punctele 20-26 din această metodă de testare. Tratamentele prin inhalare urmează a se efectua cu ajutorul dispozitivelor de inhalare nazală sau care se fixează pe cap, pentru a preveni absorbția prin alte căi de expunere (8). Dacă se utilizează alte condiții de expunere, justificarea pentru modificarea acestora ar trebui documentată. Durata de expunere prin inhalare ar trebui să fie stabilită anterior; de obicei, aceasta durează 4-6 ore.

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) OECD (2009), Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- (3) Solon E.G., Kraus L. (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J. Pharm and Tox Methods 46: 73-81.
- (4) Stumpf W.E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography, J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.
- (5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400-411.
- (6) Capitolul B.45 din prezenta anexă, „Absorbția cutanată: Metoda de testare *in vitro*”.
- (7) IPCS (2010), Characterization and application of Physiologically-Based-Pharmacokinetic Models in Risk Assessment, IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Capitolul B.44 din prezenta anexă, „Absorbția cutanată: Metoda de testare *in vivo*”.
- (10) Barton H.A. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M. and Perrier D. (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

## ▼ M4

## Apendice

## DEFINIȚII

**Absorbție:** Procesul (procesele) de asimilare a substanțelor chimice în interiorul țesuturilor sau între acestea. Absorbția se referă la compusul de origine și la toți metaboliții săi. A nu se confunda cu „biodisponibilitatea”.

**Acumulare (Bioacumulare):** Creșterea în timp a cantității unei substanțe chimice testate în țesuturi (de obicei, în țesuturile adipoase, după expunere repetată); dacă substanța chimică testată intră în corp mai repede decât este eliminată, organismul o acumulează, ceea ce poate conduce la creșterea concentrațiilor toxice.

**ADME:** Acronim pentru „Absorbție, distribuție, metabolism și excreție”.

**ASC:** Zona de sub curba concentrație plasmatică în funcție de timp (*Area under the plasma concentration-time curve*): zona aflată sub curba unui grafic care reprezintă concentrația substanței chimice testate în plasmă în funcție de timp. Aceasta reprezintă cantitatea totală de substanță chimică testată absorbită de organism într-o anumită perioadă de timp. În condiții liniare, ASC (de la momentul zero la infinit) este proporțională cu cantitatea totală a substanței chimice testate care a fost absorbită de către organism, indiferent de rata de absorbție.

**Autoradiografie:** (autoradiografia întregului corp): Utilizată pentru determinarea, din punct de vedere cantitativ și/sau calitativ, a localizării unei substanțe chimice testate radioactive în țesuturi, această tehnică utilizează razele X sau, mai recent, fosforimagistica digitală pentru a vizualiza moleculele sau fragmentele de molecule marcate radioactiv prin înregistrarea radiațiilor emise în interiorul obiectului studiat. Comparativ cu disecția organelor, autoradiografia cantitativă a întregului corp poate prezenta anumite avantaje în evaluarea distribuției substanței chimice testate și în aprecierea recuperării și resorbției generale a materialului radioactiv în țesuturi. De exemplu, unul din cele mai importante avantaje constă în faptul că poate fi utilizată într-un model pentru animale pigmentate pentru a evalua posibila asociere a substanței chimice testate cu melanina, aceasta din urmă având capacitatea de a se lega de anumite molecule. Totuși, deși poate oferi imagini de ansamblu ale locurilor cu capacitate ridicată/afinitate redusă de legare din întregul corp, această tehnică poate fi limitată în recunoașterea locurilor țintă specifice, cum sunt locurile de legare la receptori, care necesită o rezoluție și o sensibilitate înalte pentru a fi detectate. Atunci când se utilizează tehnica autoradiografierii, experimentele care au ca scop determinarea bilanțului masic al compusului administrat ar trebui efectuate pe un grup separat sau în cadrul unui studiu separat de experimentul de distribuție tisulară, prin care toate excrețiile (care pot include și aerul expirat) și carcassele integrale sunt omogenizate și analizate prin numărare în scintilație lichidă.

**Excreție biliară:** Excreție prin căile biliare.

**Bioacumulare:** A se vedea „acumulare”.

**Biodisponibilitate:** Frație a unei doze administrate care intră în circulația sistemică sau care devine disponibilă la locul activității fiziologice. De obicei, biodisponibilitatea unei substanțe chimice testate se referă la compusul de origine, dar ar putea să se refere și la metabolitul acestuia. Biodisponibilitatea ia în considerare o singură formă chimică. *Nota bene:* biodisponibilitatea și absorbția sunt noțiuni diferite. Diferența între, de exemplu, absorbția orală (prezența în peretele intestinal și în circulația portală) și biodisponibilitate (prezența în sângele sistemic și în țesuturi) poate apare ca urmare a degradării

▼ **M4**

chimice provocate de factori precum metabolizarea în peretele intestinal, transportul efluxului înapoi în lumenul intestinal sau metabolizarea presistemică hepatică (10). Biodisponibilitatea componentei toxice (compus de origine sau un metabolit) reprezintă un parametru critic al evaluării riscului la om (extrapolarea dozei în sens descendent, extrapolarea de la o cale la alta), utilizat pentru derivarea unei valori interne pe baza NOAEL sau BMD externe (doza aplicată). Absorbția orală este un parametru suficient de evaluare a efectelor hepatice la administrare orală. Totuși, pentru evaluarea oricărui alt efect în afara locului de intrare, biodisponibilitatea este, în general, un parametru mai fiabil decât absorbția pentru evaluarea riscurilor.

**Biopersistență:** A se vedea „persistență”.

**Biotransformare:** Conversia chimică (de obicei enzimatică) a unei substanțe chimice testate de interes într-o substanță chimică diferită în interiorul corpului. Sinonim cu „metabolism”.

**C<sub>max</sub>:** Concentrația maximă (de vârf) în sânge (plasmă/ser) după administrare sau excreția maximă (de vârf) (în urină sau fecale) după administrare.

**Rată de eliminare:** Măsura cantitativă a ratei cu care substanța chimică testată este îndepărtată din sânge, plasmă sau anumite țesuturi în unitatea de timp.

**Compartiment:** Porțiune (sau unitate) structurală sau biochimică individuală a unui corp, țesut sau celulă, separată de rest.

**Căi de detoxifiere:** Serie de etape de eliminare a substanțelor chimice toxice din organism, prin modificare metabolică sau prin excreție.

**Distribuție:** Dispersia unei substanțe chimice testate și a derivaților săi în tot organismul.

**Enzime/Izoenzime:** Proteine care catalizează reacții chimice. Izoenzimele sunt enzime care catalizează reacții chimice similare, dar care prezintă secvențe diferite ale aminoacizilor.

**Parametri enzimatici:** K<sub>m</sub>: constanta Michaelis și V<sub>max</sub>: viteza maximă.

**Excreție:** Proces(e) prin care substanța chimică testată administrată și/sau metabolizată sunt îndepărtați din organism.

**Exogen:** Introdus din sau produs în afara organismului sau sistemului.

**Extrapolare:** Deducerea (derivarea) uneia sau mai multor valori necunoscute pe baza informațiilor deja cunoscute sau observate.

**Timp de înjumătățire (t<sub>1/2</sub>):** Perioada necesară pentru scăderea cu 50 % a concentrației substanței chimice testate dintr-un compartiment. De obicei, se referă la concentrația plasmatică sau la cantitatea substanței chimice testate din întregul corp.

**Inducție/Inducție enzimatică:** Sinteza enzimatică declanșată de un stimul de mediu sau de o moleculă inductoare.

**Liniaritate/cinetică liniară:** Un proces este liniar din punct de vedere cinetic atunci când toate vitezele de transfer între compartimente sunt proporționale cu cantitățile sau concentrațiile prezente, adică de ordinul întâi. Prin urmare, volumele de eliminare și de distribuție și timpii de înjumătățire sunt constanți. Concentrațiile obținute sunt proporționale cu rata dozării (expunerea), iar acumularea poate fi mai ușor de anticipat. Liniaritatea/neliniaritatea poate fi evaluată prin compararea parametrilor relevanți, de exemplu ASC, după administrarea de doze diferite sau după expuneri unice și repetate. Lipsa dependenței de doză poate indica saturația enzimelor implicate în metabolizarea compusului, creșterea ASC după expunere repetată în raport cu expunerea unică poate fi un simptom de inhibare a metabolismului, în timp ce o scădere a ASC poate indica inducerea metabolismului (a se vedea, de asemenea, punctul 11).



▼ **M4**

**Bilanț masic:** Cuantificarea cantităților de substanță chimică testată care intră și iese din organism.

**Bilanț de materiale:** A se vedea „bilanț masic”.

**Mecanism (mod) de toxicitate/Mecanism (mod) de acțiune:** Mecanismul de acțiune se referă la interacțiuni biochimice specifice prin care o substanță chimică testată își produce efectul. Modul de acțiune se referă la căile generale care conduc la toxicitatea unei substanțe chimice testate.

**Metabolism:** Sinonim cu „biotransformare”.

**Metaboliți:** Produși ai metabolismului sau ai proceselor metabolice.

**Absorbție orală:** Procentul dozei de substanță chimică testată absorbită de la locul de administrare (de exemplu, tractul GI). Acest parametru critic poate fi utilizat pentru identificarea fracției din substanța chimică testată administrată care intră în vena portă, apoi în ficat.

**Coefficient de partiție:** Cunoscut și sub denumirea de coeficient de distribuție, acesta reprezintă o măsură a diferențelor de solubilitate ale unei substanțe chimice în doi solvenți.

**Niveluri maxime în sânge (ser/plasmă):** Concentrația maximă (de vârf) în sânge (plasmă/ser) după administrare (a se vedea, de asemenea, „ $C_{max}$ ”).

**Persistență (biopersistență):** Prezența pe termen lung a unei substanțe chimice (într-un sistem biologic) ca urmare a rezistenței la degradare/eliminare.

**Extrapolare:** Informațiile privind efectul produs de una sau mai multe substanțe chimice sunt utilizate pentru a anticipa efectul produs de substanța chimică țintă.

**Autoradiografie microscopică a receptorilor** (*sau microautoradiografia receptorilor*): Această tehnică poate fi utilizată pentru identificarea interacțiunii xenobiotice cu siturile tisulare sau cu populații celulare specifice, de exemplu în cadrul studiilor privind legarea la receptori sau a celor privind modul specific de acțiune, care pot necesita o rezoluție și o sensibilitate înaltă ce nu sunt disponibile prin alte tehnici, cum este autoradiografierea întregului corp.

**Cale de administrare** (*orală, intravenoasă, cutanată, inhalare etc.*): Se referă la mijloacele de introducere a substanțelor chimice în corp (de exemplu, prin gavaj oral sau prin alimentație, pe cale cutanată, prin inhalare, intravenos etc.).

**Saturație:** Stare în care unul sau mai multe din procesele cinetice (de exemplu, absorbție, metabolism sau eliminare) se află la valori maxime (sunt „saturate”).

**Sensibilitate:** Capacitatea unei metode sau a unui instrument de a face diferența între rezultate măsurătorilor reprezentând niveluri diferite ale unei variabile de interes.

**Stare staționară a concentrației sangvine (plasmatică):** Stare care nu a atins echilibrul unui sistem deschis, prin care toate forțele care acționează asupra sistemului sunt contrabalansate de forțe opuse similare, astfel încât toate componentele sistemului au o concentrație staționară în ciuda faptului că prin aceasta continuă să circule materie.

**Modelarea sistemelor** (*toxicocinetică pe bază fiziologică, pe bază farmacocinetică, farmacocinetică pe bază fiziologică, pe bază biologică etc.*): Model abstract care utilizează limbajul matematic pentru a descrie comportamentul unui sistem.

**Țesut-țintă:** țesut în care se manifestă unul din principalele efecte adverse al unei substanțe toxice.

**▼ M4**

**Substanță chimică testată:** Orice substanță sau amestec chimic care se testează utilizându-se această metodă de testare.

**Distribuție tisulară:** Deplasare reversibilă a unei substanțe chimice testate în diferite locuri din corp. Distribuția tisulară poate fi studiată prin disecția, omogenizarea sau combustia organelor, numărare în scintilație lichidă sau prin autordiografiere calitativă și/sau cantitativă a întregului corp. Prima metodă este utilă pentru calcularea concentrației și a procentului de recuperare din țesuturile și carcasele reziduale ale aceluiași animale, dar rezoluția sa poate să nu fie suficientă pentru toate țesuturile și poate să prezinte o capacitate de recuperare generală inferioară celei optime (< 90 %). Definiția ultimei metode este disponibilă mai sus.

**T<sub>max</sub>:** Perioada necesară pentru atingerea C<sub>max</sub>.

**Toxicocinetică (farmacocinetică):** Studiul absorbției, distribuției, metabolismului și excreției substanțelor chimice în timp.

**Validarea modelelor:** Procesul de evaluare a capacității unui model de a descrie datele toxicocinetice disponibile într-o manieră consecventă. Modelele pot fi evaluate prin comparare statistică și vizuală a valorilor anticipate de acestea cu valorile experimentale, în funcție de o variabilă independentă comună (de exemplu, perioada). Sfera evaluării ar trebui justificată în funcție de utilizarea preconizată pentru model.

**▼B****B.37. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANTELOR  
ORGANOFOSFORICE DUPĂ EXPUNERE ACUTĂ****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Atunci când se face evaluarea efectelor toxice ale unor substanțe, este important să se studieze capacitatea pe care o prezintă unele substanțe de a provoca anumite tipuri de neurotoxicitate pe care alte tipuri de studii nu ar putea să le evidențieze. Unii compuși organofosforici prezintă o neurotoxicitate întârziată și trebuie să fie analizate în cadrul unor asemenea studii.

Teste de depistare *in vitro* pot fi utilizate în vederea identificării substanțelor care pot provoca o polineuropatie întârziată; cu toate acestea, rezultatele negative în urma unor teste *in vitro* nu sunt suficiente pentru a demonstra că substanța testată nu este neurotoxică.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

*Substanțele organofosforice* includ esteri, tioesteri organofosforici neîncărcați sau anhidride ale acizilor organofosforici, organofosfonici sau organofosforamidici sau ale acizilor fosforotioici, fosfotioici sau fosforotioamidici din aceeași clasă sau ale unor substanțe care pot provoca neurotoxicitatea întârziată detectabilă câteodată la substanțele din această clasă.

*Neurotoxicitatea întârziată* este un sindrom asociat cu instalarea prelungită a unei ataxii întârziate, asociate cu axonopatii distale la nivelul măduvei spinării și a nervilor periferici și cu o inhibare și o îmbătrânire a esterazei caracteristică neuropatiilor (neuropathy target esterase – NTE) în țesuturile nervoase.

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

O substanță de referință poate fi testată pe un lot martor pozitiv, astfel încât să se demonstreze că, în condițiile de testare, reacția preconizată a speciei nu s-a schimbat în mod semnificativ.

Un exemplu de substanță neurotoxică cu spectru larg de utilizare este fosfat tri-o-tolil-ul (nr. CAS 78-30-8, nr. EINECS 201-103-5, nomenclatura CAS: acid fosforic, tris(2-metilfenil)ester, cunoscut și sub numele de tris-o-cresilfosfat).

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Substanța testată va fi administrată pe cale orală, într-o singură doză, unor găini de casă protejate, după caz, contra efectelor colinergice acute. Animalele sunt ținute sub observație timp de 21 de zile în vederea detectării anomaliilor de comportament, unei ataxii sau a unei paralizii. Sunt efectuate măsurători biochimice, în special pentru evidențierea inhibării esterazei NTE, pe găinile selecționate aleator din fiecare grup, în general la 24 și la 48 de ore după administrare. La 21 de zile după expunere, găinile care au mai rămas sunt sacrificate și se va efectua o examinare histopatologică a țesuturilor nervoase selecționate.

**▼B****1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.5.1. Pregătirea testului**

Găini adulte tinere, fără afecțiuni virale sub tratamente care pot intra în interferență cu substanța testată și care nu prezintă tulburări ale aparatului locomotor, sunt distribuite aleator în grupuri experimentale și în loturi martor și lăsate să se aclimatizeze la condițiile de laborator cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului.

Cuștile sau incintele sunt destul de voluminoase pentru a permite o mișcare liberă găinilor, astfel încât mersul lor să poată fi observat ușor.

Substanța testată va fi administrată în general pe cale orală, prin gavaj sau în capsule de gelatină sau printr-o metodă asemănătoare. Substanțele lichide pot fi administrate în mod direct sau dizolvate într-un vehicul adecvat, cum ar fi uleiul de porumb; substanțele solide trebuie dizolvate, dacă este posibil, altfel se poate întâmpla ca importante cantități de substanțe solide administrate în capsule de gelatină să nu fie absorbite în mod corespunzător. Dacă vehiculul este altul decât apa, caracteristicile sale toxice trebuie să fie cunoscute sau, în caz contrar, determinate înaintea începerii testului.

**1.5.2. Condiții de testare****1.5.2.1. Animalele de experiență**

Specia recomandată este găina domestică ouătoare adultă și tânără, de o vârstă cuprinsă între 8-12 luni (*Gallus gallus domesticus*). Se vor folosi rase și linii pure de mărime standard; în mod normal, găinile folosite au fost crescute în condiții care le-au permis mișcarea liberă.

**1.5.2.2. Număr și sex**

În afară de grupul experimental, va fi selecționat și un lot martor căruia i se administrează doar vectorul, precum și un lot martor pozitiv. Grupul căreia i se administrează doar vectorul va fi tratat la fel ca și grupul experimental, singura excepție constând în administrarea substanței testate.

Trebuie selecționat un număr suficient de ridicat de animale în fiecare grup, astfel încât să se poată sacrifica cel puțin șase în vederea efectuării măsurărilor biochimice (trei la ambele prelevări) și astfel încât să supraviețuiască cel puțin șase după perioada de observație de 21 de zile.

Lotul martor pozitiv poate fi studiat în paralel sau se pot folosi datele unui studiu realizat recent. Trebuie să fie constituit din cel puțin șase găini adulte tratate cu un produs neurotoxic cunoscut, cu efect întârziat; trei găini sunt rezervate măsurărilor biochimice și trei evidențierii semnelor patologice. Se recomandă actualizarea periodică a datelor istorice colectate anterior. Sunt selecționate alte grupuri martor pozitiv, în cazul în care una dintre condițiile esențiale ale testului (cum ar fi linia pură, alimentația, adăpostirea) va fi modificată de către laboratorul care efectuează testul.

**▼B****1.5.2.3. Doze**

Se recomandă efectuarea unui studiu preliminar pe un număr adecvat de găini, distribuite aleator în grupuri experimentale tratate cu doze diferite, în vederea determinării dozei care va fi utilizată în cadrul studiului principal. O anumită rată a mortalității este inevitabilă în acest studiu preliminar. Cu toate acestea, pentru a se evita moartea din cauza efectelor colinergice acute, se poate folosi atropina sau un alt agent protector care să nu perturbe reacția neurologică întârziată. Se pot folosi metode de testare diverse pentru a se evalua doza maximă care nu este letală la o substanță dată (a se vedea metoda B.1 *bis*). Datele colectate anterior pe găini sau alte informații de ordin toxicologic sunt luate, de asemenea, în considerare la determinarea dozei.

Doza utilizată în studiul principal trebuie să fie cât se poate de ridicată, avându-se în vedere rezultatele studiului anterior și limita superioară de 2 000 mg/kg greutate corporală. Oricare ar fi rata mortalității, trebuie să supraviețuiască un număr suficient de animale pentru a se putea efectua măsurările biochimice (șase) și examenele histologice (șase), în cea de-a 21-a zi. Se va utiliza atropina sau un alt agent care nu perturbă reacțiile neurotoxice întârziate, astfel încât să se evite mortalitatea datorită efectelor colinergice acute.

**1.5.2.4. Testul-limită**

Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 2 000 mg/kg greutate corporală/zi nu produce efecte toxice detectabile și dacă informațiile cu privire la substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea acestora, nu este necesar să se efectueze un studiu cu o doză mai ridicată. Testul-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

**1.5.3. Perioada de observație**

Perioada de observație este de 21 de zile.

**1.5.4. Procedură**

După administrarea unui agent protector în vederea evitării provocării morții din cauza efectelor colinergice acute, se administrează substanța testată într-o singură doză.

**Observații generale**

Observațiile încep imediat după expunere. Toate găinile sunt observate cu grijă de mai multe ori în cursul primelor două zile, după care cel puțin o dată pe zi, timp de 21 de zile sau până în data sacrificării. Se înregistrează toate manifestările de toxicitate, data apariției anomaliilor de comportament, tipul, gravitatea și durata lor. Ataxia se măsoară cu ajutorul unei scale de evaluare obișnuite cu cel puțin patru niveluri; paralizia trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe săptămână găinile destinate evidențierii semnelor patologice, sunt scoase din cuști și supuse unei activități locomotorii forțate, cum ar fi de exemplu urcarea pe scară, astfel încât să se faciliteze examinarea manifestării efectelor toxice ușoare. Animalele muribunde sau cele care prezintă semne de suferință sau dureri intense trebuie excluse imediat din studiu, eutanasiate și autopsiate.

**▼B****Greutate corporală**

Toate găinile sunt cântărite cu puțin înaintea administrării substanței, după care cel puțin o dată pe săptămână.

**Biochimie**

Șase găini selecționate aleator din fiecare grup experimental și din grupurile martor negative, precum și trei găini din lotul martor pozitiv (dacă testul este realizat în paralel și pe acesta) sunt sacrificate câteva zile după administrare, creierul și măduva spinării din zona lombară sunt preparate și analizate în vederea detectării inhibării esterazei caracteristică neuropatiilor. Pe lângă aceasta, poate să fie necesară și analiza inhibării acestei esteraze pe nervul sciatic. În general, sunt sacrificate trei găini din lotul martor și din fiecare grup experimental, după 24 de ore și alte trei, după 48 de ore, iar cele trei găini din lotul martor pozitiv sunt sacrificate după 24 de ore. Dacă observarea semnelor clinice de intoxicare (estimate deseori pe baza momentului apariției efectelor colinergice) indică faptul că substanța toxică se elimină în mod foarte lent, se poate să fie preferabilă prelevarea țesuturilor de la trei găini la alte intervale de timp, între 24 sau cel mult 72 de ore după administrare.

Dacă este necesar, se pot efectua, de asemenea, determinări de acetilcolinesterază (AChE) pe eşantioane. Cu toate acestea, poate avea loc *in vivo* o reactivare spontană a acetilcolinesterazei, fapt care ar duce la subestimarea activității de inhibitor de AChE a substanței.

**Autopsia**

Autopsia tuturor animalelor (sacrificii prevăzute sau impuse de starea animalului) trebuie să includă o examinare a aspectului creierului și a măduvei spinării.

**Examinarea histopatologică**

Țesuturile nervoase ale tuturor animalelor care au supraviețuit după perioada de observație și care nu au fost utilizate pentru măsurări biochimice, trebuie să fie supuse unui examen microscopic. Țesuturile trebuie fixate *in situ* prin tehnica perfuziei. Secțiunile sunt practicate la nivelul cerebelului (pe plan longitudinal mediu), al bulbului rahidian, al măduvei spinării și al nervilor periferici. Secțiunile din măduva spinării sunt practicate pe segmentul cervical superior, în regiunea toracică medie și în regiunea lombo-sacrală. Se vor efectua secționări și în partea distală al nervului tibial, la nivelul ramurilor acestuia spre mușchii gastrocnemieni, precum și la nivelul nervului sciatic. Secțiunile sunt colorate cu ajutorul unor coloranți adecvați, specifici mielinei și axonilor.

**2.****DATE**

De regulă, rezultatele obținute pentru diferitele criterii de evaluare reținute (biochimice, histopatologice și cele referitoare la examinarea comportamentului) sunt negative, în mod normal, nu mai este nevoie să se recurgă la teste de neurotoxicitate întârziată. Rezultatele ambigue sau neconcludente pot impune continuarea studiului.

Datele sunt indicate pentru fiecare animal separat. Pe lângă aceasta, datele sunt incluse într-un tabel care va indica la fiecare grup experimental, numărul de animale prezente la începutul testului, numărul de animale care prezintă leziuni, anomalii de comportament sau modificări biochimice, tipul și gravitatea leziunilor sau tulburărilor, precum și procentajul de animale care prezintă fiecare tip de leziuni sau tulburări, la diferite niveluri de gravitate.

**▼B**

Rezultatele acestui studiu trebuie evaluate din punct de vedere al incidenței lor asupra efectelor comportamentale, biochimice și histopatologice sau asupra oricărui alt efect observat la grupurile experimentale și cele martor sau din punct de vedere al gravității acestora și al corelării dintre ele.

Rezultatele cifrice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și recunoscute. Metoda statistică trebuie să fie aleasă cu ocazia elaborării studiului.

### 3. **RAPORT**

#### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare va conține, pe cât posibil, următoarele informații:

#### 3.1. Animale de experiență:

- linia pură utilizată;
- numărul animalelor, vârsta, sexul;
- originea, condiții de adăpostire etc.;
- greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

#### 3.2. Condiții de testare:

- detalii cu privire la prepararea substanței testate și la stabilitatea și omogenitatea preparatului, dacă este posibil;
- justificarea alegerii vehiculului;
- detalii cu privire la administrarea substanței testate;
- detalii asupra calității hranei și a apei;
- justificarea alegerii dozei;
- specificarea dozelor administrate, cu indicații detaliate cu privire la vehicul, la volumul și starea de agregare a substanței administrate;
- eventual, identitatea agentului protector utilizat și detalii cu privire la administrarea acestuia.

#### 3.3. Rezultate:

- informații cu privire la greutatea corporală;
- informații cu privire la reacția toxică pe grupuri, inclusiv mortalitatea;
- natura, gravitatea și durata efectelor clinice observate (eventual, reversibilitatea acestora);
- descrierea detaliată a metodelor și rezultatelor biochimice;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;
- prelucrare statistică a rezultatelor, după caz.

Evaluarea rezultatelor.

Concluzii.

### 4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 418 a OCDE.

**▼B****B.38. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANTELOR ORGANOFOSFORICE – STUDIU CU ADMINISTRARE ÎN MOD REPETAT PE O DURATĂ DE 28 DE ZILE****1. METODĂ****1.1. INTRODUCERE**

Atunci când se face evaluarea efectelor toxice ale unor substanțe, este important să se studieze capacitatea pe care o prezintă unele substanțe de a provoca anumite tipuri de neurotoxicitate pe care alte tipuri de studii nu ar putea să le evidențieze. Unii compuși organofosforici prezintă o neurotoxicitate întârziată și trebuie să fie supuși unor asemenea studii.

Teste de depistare *in vitro* pot fi utilizate în vederea identificării substanțelor care ar putea provoca o polineuropatie întârziată; cu toate acestea, rezultatele negative în urma unor teste *in vitro* nu sunt suficiente pentru a demonstra că substanța testată nu este neurotoxică.

Acest test de neurotoxicitate întârziată pe o durată de 28 de zile furnizează informații despre eventualele riscuri pentru sănătate, ca urmare a unor expuneri repetate în cursul unei perioade determinate. Acest test furnizează informații asupra relației doză-efect, precum și o estimare a nivelului dozei care nu are efecte nefaste detectabile și care poate fi utilă la stabilirea criteriilor de securitate în cazul unei expuneri.

A se vedea, de asemenea, introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

Substanțele organofosforice includ esteri, tioesteri organofosforici neîncărcați sau anhidrați ale acizilor organofosforici, organofosfonici sau organofosforamidici sau ale acizilor fosforotioici, fosfonotioici sau fosforotioamidici din aceeași clasă sau ale altor substanțe care pot provoca neurotoxicitatea întârziată detectabilă câteodată la substanțele din această clasă.

Neurotoxicitatea întârziată este un sindrom asociat cu instalarea prelungită a unei ataxii întârziate, asociate cu axonopatii distale la nivelul măduvei spinării și a nervilor periferici și cu o inhibare și o îmbătrânire a esterasei caracteristică neuropatiilor (neuropathy target esterase – NTE) în țesuturile nervoase.

**1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Substanța testată se administrează pe cale orală, timp de 28 de zile, unor găini de casă. Animalele sunt observate cel puțin o dată zilnic, până în a 14-a zi după administrarea ultimei doze, în vederea detectării tulburărilor de comportament, a unei ataxii sau a unei paralizii. Sunt efectuate măsurări biochimice, în special pentru evidențierea inhibării esterasei NTE, pe găinile selecționate aleator din fiecare lot, în general la 24 și la 48 de ore după ultima administrare. La două săptămâni după ultima administrare, găinile care au mai rămas sunt sacrificate și se efectuează examinarea histopatologică a țesuturilor nervoase selecționate.



**▼B****1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.4.1. Pregătirea testului**

Găini adulte tinere, fără afecțiuni virale supuse unor tratamente care pot intra în interferență cu substanța testată și care nu prezintă tulburări ale aparatului locomotor, sunt distribuite aleator în grupuri experimentale și în loturi martor și sunt lăsate să se aclimatizeze la condițiile de laborator, cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului.

Cuștile sau incintele sunt destul de voluminoase pentru a permite o mișcare liberă găinilor, astfel încât mersul lor să poată fi observat ușor.

Substanța testată va fi administrată zilnic, șapte zile din șapte, pe cale orală, prin gavaj sau prin capsule de gelatină. Substanțele lichide pot fi administrate în mod direct sau dizolvate într-un vehicul adecvat, cum ar fi uleiul de porumb; substanțele solide trebuie dizolvate, dacă este posibil, altfel se poate întâmpla ca importante cantități de substanțe solide administrate în capsule de gelatină să nu fie absorbite în mod corespunzător. Dacă vehiculul este altul decât apa, caracteristicile sale toxice trebuie să fie cunoscute sau, în caz contrar, trebuie determinate înaintea începerii testului.

**1.4.2. Condiții de testare****Animalele de experiență**

Specia recomandată este găina domestică ouătoare adultă și tânără, de o vârstă cuprinsă între 8-12 luni (*Gallus gallus domesticus*). Se folosesc rase și linii pure de mărime standard; în mod normal, găinile folosite au fost crescute în condiții care le-au permis mișcarea liberă.

**Număr și sex**

Ca regulă generală, se lucrează cu cel puțin trei grupuri experimentale și un lot martor căreia i se administrează doar vectorul. Grupul căreia i se administrează doar vectorul, va fi tratat la fel ca și grupul experimental, singura excepție constând în administrarea substanței testate.

Trebuie selecționat un număr suficient de ridicat de animale în fiecare grup, astfel încât să se poată sacrifica cel puțin șase găini în vederea efectuării măsurărilor biochimice (trei la ambele prelevări) și astfel încât să supraviețuiască cel puțin șase după perioada de observație de după tratament de 14 zile.

**Doze**

Dozele trebuie selecționate ținându-se de cont de rezultatele unui test de neurotoxicitate întârziată după expunere acută și de orice alte informații disponibile cu privire la toxicitatea sau la cinetica substanței testate. Se selecționează doza cea mai ridicată, astfel încât aceasta să producă efecte toxice și de preferință o neurotoxicitate întârziată, fără să ducă însă la moarte sau la suferințe intense. După aceasta se definesc o serie de doze descrescătoare, astfel încât să se evidențieze o eventuală relație doză-efect, precum și o doză minimă fără niciun efect detectabil.

**▼B****Testul-limită**

Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă informațiile relevante despre substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea acestora, nu este necesară efectuarea unui studiu la o doză mai ridicată. Testul-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

**Perioada de observație**

Toate animalele sunt observate cel puțin o dată zilnic, în timpul expunerii și în următoarele 14 zile, dacă nu este programată sacrificarea lor în vederea efectuării autopsiei.

**1.4.3. Mod de lucru**

Substanța testată se administrează zilnic, șapte zile din șapte, timp de 28 de zile.

**Observații generale**

Observațiile încep imediat după expunere. Toate găinile sunt observate cu atenție cel puțin o dată pe zi, în timpul celor 28 de zile de tratament și în cursul celor 14 zile după ultima administrare sau până în data sacrificării. Sunt notate toate manifestările de toxicitate, data apariției, tipul, gravitatea și durata lor. Observația are în vedere tulburările de comportament, dar nu trebuie să se limiteze la acestea. Ataxia va fi măsurată cu ajutorul unei scale de evaluare obișnuite cu cel puțin patru niveluri; paralizia trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe săptămână găinile sunt scoase din cuști și supuse unei activități locomotorii forțate, cum ar fi de exemplu urcarea pe scară, astfel încât să se faciliteze examinarea manifestării efectelor toxice ușoare. Animalele muribunde sau cele care prezintă semne de suferință sau dureri intense trebuie excluse imediat din studiu, eutanasiate și supuse autopsiei.

**Greutate corporală**

Toate găinile sunt cântărite cu puțin înaintea primei administrări a substanței, după care cel puțin o dată pe săptămână.

**Biochimie**

Șase găini selecționate aleator din fiecare grup experimental și din grupurile martor cărora li se administrează doar vectorul, sunt sacrificate câteva zile după ultima administrare; creierul și măduva spinării din zona lombară se prepară și se analizează în vederea detectării inhibării esterazei caracteristice neuropatiilor (NTE). Pe lângă aceasta, poate să fie necesară și analiza inhibării acestei esteraze pe nervul sciatic. În general, sunt sacrificate trei găini din lotul martor și din fiecare grup experimental, 24 de ore după ultima administrare și alte trei, după alte 24 de ore, și anume 48 de ore după ultima administrare; dacă pe baza rezultatelor studiului prin expunere acută sau ale altor studii (studiul toxicocinetic, de exemplu) se consideră că ar fi indicată alegerea unor altor intervale de timp pentru sacrificii, acestea pot fi modificate în consecință cu condiția furnizării documentelor justificative.

Dacă este necesar, se pot efectua, de asemenea, măsurări de acetilcolinesterază (AChE) pe eșantioane. Cu toate acestea, poate avea loc *in vivo* o reactivare spontană a acetilcolinesterazei, fapt care ar duce la subestimarea activității de inhibitor de AChE a substanței.

**▼B****Autopsia**

Autopsia tuturor animalelor (sacrificii prevăzute sau impuse de starea animalului) trebuie să includă o examinare a aspectului creierului și a măduvei spinării.

**Examinarea histopatologică**

Țesuturile nervoase ale tuturor animalelor care au supraviețuit după perioada de observație și care nu au fost utilizate pentru măsurări biochimice, trebuie să fie supuse unui examen microscopic. Țesuturile trebuie fixate *in situ* prin tehnica perfuziei. Secțiunile sunt practicate la nivelul cerebelului (pe plan longitudinal mediu), al bulbului rahidian, al măduvei spinării și al nervilor periferici. Secțiunile la măduva spinării sunt practicate în segmentul cervical superior, în regiunea toracică medie și în regiunea lombo-sacrală. Se vor efectua secționări și în partea distală a nervului tibial și la nivelul ramurilor acestuia spre mușchii gemeni ai tricepsului, precum și la nivelul nervului sciatic. Secțiunile sunt colorate cu ajutorul unor coloranți adecvați, specifici mielinei și axonilor. Mai întâi, examinarea histopatologică va fi efectuată asupra Țesuturilor conservate prelevate de la toate animalele din grupul experimental cărora li s-a administrat doza cea mai ridicată și din lotul martor. Dacă există efecte detectabile la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai ridicată, se va efectua un examen microscopic și asupra Țesuturilor animalelor cărora li s-a administrat doza intermediară, respectiv doza cea mai scăzută.

**2. DATE**

De regulă, dacă rezultatele obținute pentru diferitele criterii de evaluare reținute la această metodă (biochimice, histopatologice și cele referitoare la comportament) sunt negative, nu mai este nevoie să se recurgă la teste de neurotoxicitate întârziată. Rezultatele ambigue sau neconcludente pot impune continuarea studiului.

Datele sunt indicate pentru fiecare animal individual. Pe lângă aceasta, datele sunt incluse într-un tabel care va indica la fiecare grup experimental, numărul de animale prezente la începutul testului, numărul de animale care prezintă leziuni, anomalii de comportament sau modificări biochimice, tipul și gravitatea acestor leziuni sau simptome, precum și procentajul de animale care prezintă fiecare tip de leziuni sau simptome la diferite niveluri de gravitate.

Rezultatele acestui studiu trebuie evaluate din punct de vedere al incidenței lor asupra efectelor comportamentale, biochimice și histopatologice sau asupra oricărui alt efect observat la grupurile experimentale și cele martor sau din punct de vedere al gravității acestora și al corelării dintre ele.

Rezultatele cifrice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și recunoscute. Metoda statistică va fi aleasă cu ocazia elaborării studiului.

**3. RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare va conține, dacă este posibil, următoarele informații:

**3.1. Animale de experiență:**

- linia pură utilizată;
- numărul animalelor, vârsta;
- originea, condiții de adăpostire etc.;
- greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

**▼B**

## 3.2. Condiții de testare:

- detalii cu privire la prepararea substanței testate și la stabilitatea și omogenitatea preparatului, dacă este posibil;
- justificarea alegerii vehiculului;
- detalii cu privire la administrarea substanței testate;
- detalii asupra calității hranei și a apei;
- justificarea alegerii dozei;
- specificarea dozelor administrate, cu indicații detaliate cu privire la vehicul, la volumul și la starea de agregare a substanței administrate;
- dacă măsurările biochimice nu sunt efectuate la 24 și 48 de ore după ultima administrare, justificarea alegerii intervalelor de timp practicate.

## 3.3. Rezultate:

- informații cu privire la greutatea corporală;
- informații cu privire la reacția toxică pe grupuri, inclusiv mortalitatea;
- nivelul dozei fără efect nefast detectat;
- natura, gravitatea și durata efectelor clinice detectate (eventual, reversibilitatea acestora);
- descrierea detaliată a metodelor și rezultatelor biochimice;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;
- prelucrare statistică a rezultatelor, după caz.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 419 a OCDE.

**▼B****B.39. TEST *IN VIVO* DE SINTEZĂ NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS)  
PE CELULE HEPATICE DE MAMIFERE****1. METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 486 a OCDE, Testul *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere (1997).

**1.1. INTRODUCERE**

Scopul testului *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere este identificarea substanțelor de testat care induc regenerarea ADN în celulele hepatice ale animalelor (1) (2) (3) (4).

Prezentul test *in vivo* oferă o metodă pentru studiul efectelor genotoxice ale produselor chimice în ficat. Efectul măsurat este o indicație a deteriorării ADN și a regenerării ulterioare a acestuia în celulele hepatice. Ficatul este, de obicei, principalul loc de metabolism al compușilor absorbiți. De aceea, este un loc corespunzător pentru determinarea *in vivo* a degradării ADN.

Dacă există dovezi că substanța de testat nu ajunge la țesutul țintă, nu este indicată utilizarea prezentului test.

Sinteza neprogramată a ADN (UDS) se determină prin încorporarea nucleozidelor marcate în celulele care nu suferă o sinteză programată (faza S) a ADN. Metoda utilizată cel mai frecvent constă în determinarea prin autoradiografie a timidinei marcate cu tritiu <sup>3</sup>H-TdR care a fost încorporată. Pentru testele *in vivo*, USD se preferă utilizarea ficatului de șobolan. Se pot utiliza și alte țesuturi, dar acestea nu constituie obiectul prezentei metode.

Detectarea unui răspuns UDS depinde de numărul de baze din ADN excizate și înlocuite la locul modificării. Prin urmare testul UDS este valoros în special pentru detectarea regenerării secvențelor lungi (20-30 de baze) induse de substanță. Spre deosebire de acestea, pentru detectarea regenerării secvențelor scurte (1-3 baze) este necesară o sensibilitate mult mai mică. În plus, datorită nereparării, unei reparări eronate sau a unei replicări eronate a leziunilor din ADN, pot apărea fenomene mutagene. Amploarea răspunsului UDS nu oferă nicio indicație despre fidelitatea procesului de regenerare. În plus, este posibilă reacția unui mutagen cu ADN, fără ca modificarea ADN rezultată să poată fi remediată printr-un proces de reparare prin excizie. În testul UDS, lipsa informațiilor specifice privind activitatea mutagenă este compensată de sensibilitatea potențială a acestui efect, care se poate măsura în totalitatea genomului.

A se vedea și introducerea generală partea B.

**1.2. DEFINIȚII**

**Celule în curs de reparare:** număr net de grăunți nucleari (NNG) mai mare decât o valoare prestabilită, ce trebuie justificată de laboratorul care realizează testul.

**Număr net de grăunți nucleari (NNG):** măsură cantitativă a activității UDS a celulelor în testele autoradiografice UDS, calculată prin scăderea numărului mediu de grăunți citoplasmici din zonele citoplasmice echivalente nucleului (CG) din numărul de grăunți nucleari (NG):  $NNG = NG - CG$ . NNG se calculează pentru celulele individuale, iar apoi se extrapolează pentru celulele dintr-o cultură, din culturi paralele etc.

**▼B**

**Sinteza neprogramată a ADN (UDS):** sinteza reparării ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici.

### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul *in vivo* UDS pe celule hepatice de mamifere indică o sinteză de reparare a ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici. Testul se întemeiază, de obicei, pe încorporarea  $^3\text{H}$ -TdR în ADN-ul celulelor hepatice care prezintă o frecvență redusă de celule în faza S a ciclului celular. Încorporarea  $^3\text{H}$ -TdR se determină, de obicei, prin autordiografie, deoarece această tehnică nu este sensibilă la interferența cu celulele în fază S, așa cum este, de exemplu, numărătoarea în scintilație lichidă.

### 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

#### 1.4.1. Pregătirea testului

##### 1.4.1.1. *Selectarea speciei de animale*

Se utilizează, de obicei, șobolani, deși se poate utiliza orice specie de mamifere. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase din sușe folosite în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte variații minime, ce nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex.

##### 1.4.1.2. *Condițiile de adăpostire și de hrănire*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

##### 1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Animalele sunt identificate individual și se țin în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

##### 1.4.1.4. *Substanța de testat/Preparare*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

#### 1.4.2. Condițiile de testare

##### 1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

**▼B****1.4.2.2. Martorii**

Martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul) utilizați în paralel ar trebui să se includă în fiecare parte a experimentului, realizată independent. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să fie substanțe despre care se știe că produc UDS atunci când se administrează în doze de expunere estimate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Martorii pozitivi care necesită o activare metabolică ar trebui să se utilizeze în doze care provoacă un răspuns moderat (4). Dozele se pot alege astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinătorului identitatea lamelelor codificate. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

| Momentele de prelevare a probelor | Substanța                      | Nr. CAS | Nr. EINECS |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------|------------|
| Primele prelevări (2-4 ore)       | N-nitrozodimetilamină          | 62-75-9 | 200-249-8  |
| Ultimele prelevări (12-16 ore)    | N-2-fluorenilacetamidă (2-AAF) | 53-96-3 | 200-188-6  |

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi. Martorul pozitiv ar trebui să se administreze pe o cale diferită de cea pentru substanța de testat.

**1.5. MOD DE LUCRU****1.5.1. Numărul și sexul animalelor**

Ar trebui să se utilizeze un număr suficient de animale pentru a ține seama de variația răspunsului testului în funcție de natura biologică. Ar trebui să se utilizeze un număr de minimum trei animale analizabile din fiecare grupă. Dacă în momentul studiului există date acumulate din experimentele anterioare, sunt necesare doar unul sau două animale pentru grupele de martorii pozitivi și negativi analizate în paralel.

Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceleași specii, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex, de preferință de sex masculin. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sexul corespunzător.

**1.5.2. Modalitatea de tratare**

Substanțele se administrează în general într-o singură repriză.

**1.5.3. Dozele**

În mod normal, se utilizează minimum două doze diferite. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. În general, doza mai mică trebuie să fie egală cu 50 % până la 25 % din doza mare.

## ▼B

Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (ca hormonii și mitogenii) pot să facă excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui evaluate pentru fiecare caz în parte. Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex și regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal.

Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în ficat (de exemplu nuclee picnotice).

#### 1.5.4. Testul-limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corporală, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet nu este necesar. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul limită.

#### 1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau a unei canule de intubație adaptate. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Cu toate acestea, calea intraperitoneală nu se recomandă, deoarece probabilitatea de expunere a ficatului este mai mare decât la administrarea prin intermediul sistemului circulator. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

#### 1.5.6. Prepararea celulelor hepatice

Prelevarea celulelor hepatice de la animalele tratate se realizează, de obicei, după 12-16 ore de la administrarea dozei. În general, mai este necesară o prelevare (de obicei, după 2-4 ore de la tratament), cu excepția cazului în care există un răspuns pozitiv net după 12-16 ore. Cu toate acestea, se pot utiliza și alte momente de prelevare, dacă datele toxicokinetică justifică acest lucru.

Culturile pe termen scurt de celule hepatice de mamifere se realizează, de obicei, perfuzând ficatul *in situ* cu collagenază și lăsând celulele hepatice proaspăt dissociate să se fixeze pe o suprafață corespunzătoare. Celulele hepatice de la animale martori negativi ar trebui să aibă o viabilitate (5) de minimum 50 %.

#### 1.5.7. Determinarea UDS

Celulele hepatice proaspăt izolate se supun în general incubării într-un mediu, ce conține <sup>3</sup>H-TdR, pentru o perioadă de timp corespunzătoare, de exemplu 3-8 ore. La încheierea perioadei de incubare, ar trebui ca mediul să fie îndepărtat de pe celule, care pot să fie incubate apoi într-un mediu ce conține timidină nemarcată în exces, pentru diminuarea radioactivității neîncorporate („cold chase”). Celulele sunt apoi spălate, fixate și uscate. Pentru perioade de incubare mai lungi, s-ar putea ca procedeul „cold chase” să nu fie necesar. Lamelele sunt imersate în soluție autoradiografică, păstrate la întuneric (de exemplu refrigerate timp de 7-14 zile), dezvoltate, colorate și apoi se procedează la numărarea grăunților de argint expuși. Pentru fiecare animal se pregătesc două până la trei lamele.



**▼B****1.5.8. Analiza**

Preparatele depuse pe lamele ar trebui să conțină un număr suficient de celule cu o morfologie normală, pentru a permite o evaluare semnificativă a UDS. Preparatele se examinează la microscop pentru identificarea semnelor de citotoxicitate evidentă (de exemplu picnoză, diminuarea nivelului de marcaj radioactiv).

Se recomandă codificarea lamelelor înainte de numărătoarea grăunților. În general, pentru fiecare animal se identifică 100 de celule pe minimum două lamele; numărătoarea unui număr de celule mai mic de 100 pentru fiecare animal ar trebui justificată. Numărul de grăunți nu se determină pentru nucleeele în fază S, dar se poate înregistra proporția de celule în faza S.

Cantitatea de  $^3\text{H-TdR}$  încorporată în nucleee și citoplasma celulelor normale din punct de vedere morfologic, puse în evidență prin depunerea de grăunți de argint, ar trebui să se determine prin metode corespunzătoare.

Numărul grăunților se determină pe baza nucleelor (grăunți nucleari, NG), iar zonele echivalente nucleului se determină pe baza citoplasmei (grăunți citoplasmici, CG). Numărul CG se obține măsurând fie zona cea mai marcată a citoplasmei, fie media a două sau trei numărători de grăunți citoplasmici adiacenți nucleului. Se pot folosi și alte metode de numărare (de exemplu numărarea celulelor complete), în măsura în care acestea pot fi justificate (6).

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Ar trebui să se prezinte date pentru fiecare lamelă și pentru fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să se prezinte sub formă de tabel. Numărul net de grăunți nucleari (NNG) ar trebui să se calculeze pentru fiecare celulă, pentru fiecare animal și pentru fiecare doză și moment de prelevare prin scăderea numărului CG din numărul NG. Dacă se face numărătoarea „celulelor în curs de reparare”, ar trebui să se justifice criteriile folosite la definirea „celulelor în curs de reparare”, care ar trebui să se întemeieze pe datele obținute din experimentele anterioare sau pe datele obținute pe martori negativi testați în paralel. Pentru evaluarea rezultatelor numerice se pot utiliza metode statistice. În acest caz, ar trebui, înaintea realizării studiului, să se selecteze și să se justifice testele statistice.

**2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Exemplele de criterii de răspunsuri pozitive/negative includ:

- |         |   |
|---------|---|
| pozitiv | (i) valori ale NNG mai mari de o valoare-prag stabilită, care se justifică prin datele obținute în laborator în experimente anterioare; sau |
|         | (ii) valori ale NNG cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel;  |
| negativ | (i) valori ale NNG egale cu/mai mici decât valoarea-prag pentru martor, rezultată din experimente anterioare; sau                           |
|         | (ii) valori ale NNG care nu sunt cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel.   |

**▼B**

Ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor, și anume ar trebui să se țină seama de parametri ca variația între animale, relația doză-răspuns și citotoxicitatea. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice. Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în anumite cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Un rezultat pozitiv al unui test UDS *in vivo* pe celule hepatice de mamifere indică faptul că substanța de testat produce leziuni *in vivo* ale ADN din celulele hepatice ale mamiferelor, care se pot remedia prin sinteza neprogramată a ADN *in vitro*. Un rezultat negativ indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu produce o deteriorare a ADN care să se poată detecta prin prezentul test.

Ar trebui să se discute probabilitatea ca substanța de testat să ajungă în circulația generală sau la țesutul țintă (de exemplu toxicitatea sistemică).

3.

**RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

- martorii pozitivi și negativi vehicul/solvent;
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind modalitatea de administrare selectată;
- justificarea căii de administrare alese;
- metode de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul țintă, dacă este cazul;

**▼B**

- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- metoda de preparare și de cultură a celulelor hepatice;
- metoda autoradiografică utilizată;
- numărul de lamele preparate și numărul de celule numărate;
- criteriile de evaluare;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

## Rezultatele:

- valorile medii ale numărului de grăunți nucleari, grăunți citoplasmatici și ale numărului net de grăunți nucleari pentru fiecare lamelă, fiecare animal și fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- evaluarea statistică, dacă există;
- semnele de toxicitate;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- numărul de celule „în curs de reparare”, dacă s-a determinat;
- numărul de celule în faza S, dacă s-a determinat;
- viabilitatea celulelor.

## Discutarea rezultatelor.

## Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
2. Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
3. Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

**▼B**

4. Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, 312, pp. 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
6. Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553-562.

**▼B****B.40. COROZIUNEA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL REZISTENȚEI ELECTRICE TRANSCUTANATE (RET)****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 430 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Coroziunea cutanată se referă la producerea unei vătămări ireversibile a țesuturilor pielii ca urmare a aplicării unei substanțe de testare [definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor și amestecurilor chimice (GHS)] (1). Această metodă prevede o procedură de evaluare a corozivității care nu se efectuează pe animale vii.

Evaluarea corozivității cutanate a implicat în mod obișnuit utilizarea animalelor de laborator (2). Preocuparea pentru durerea și suferința pe care această metodă le implică s-a concretizat în revizuirea metodei de testare B.4 care permite determinarea nivelului de coroziune cutanată utilizând metode alternative, *in vitro*, prin care se evită provocarea durerii și suferinței animalelor.

O primă etapă către definirea unor teste alternative care ar putea fi folosite pentru testarea corozivității cutanate în vederea reglementării acestora a constat în efectuarea de studii de pre-validare (3). Ca urmare, s-a realizat (6) (7) (8) un studiu precis de validare a metodelor *in vitro* pentru determinarea coroziei cutanate (4) (5). Rezultatele acestor studii și al literaturii de specialitate publicate au arătat că următoarele teste ar putea fi folosite pentru evaluarea *in vivo* a corozivității cutanate (9) (10) (11): testarea pe un model de piele umană (a se vedea metoda de testare B.40 bis) și testul rezistenței electrice transcutanate (prezenta metodă).

Într-un studiu de validare și în alte studii publicate s-a menționat că testul rezistenței electrice transcutanate (RET) efectuat pe o piele de șobolan (12) (13) poate face distincția, într-o manieră fiabilă, între substanțele corozive și necorozive pentru piele cunoscute (5) (9).

Testul descris în această metodă permite identificarea amestecurilor și a substanțelor chimice corozive. În egală măsură, acesta permite identificarea amestecurilor și a substanțelor necorozive pe baza altor elemente de determinare, folosind alte informații existente (de exemplu pH-ul, relații structură-activitate, date despre om sau/și animal) (1) (2) (11) (14). Nu furnizează informații cu privire la iritarea cutanată și nici nu face sub-clasificarea substanțelor corozive, așa cum se procedează în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor și amestecurilor chimice (GHS) (1).

Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere, se recomandă să se urmeze strategia de testare secvențială anexată la metoda de testare B.4 (2) și prevăzută în Sistemul global armonizat (1). Această strategie de testare include efectuarea de teste *in vitro* pentru coroziunea cutanată (așa cum sunt descrise în prezenta metodă) și pentru iritarea cutanată înainte de a se lua în considerare testarea pe animale vii.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Coroziune cutanată *in vivo*:** producerea unei vătămări ireversibile a pielii, și anume necroza vizibilă prin epidermă și în dermă ca urmare a aplicării unei substanțe de testare pentru o durată de până la patru ore. Reacțiile corozive sunt caracterizate de ulceratii, sângerări, cruste însângerate și, la sfârșitul perioadei de observare de 14 zile, decolorare datorată albirii pielii, zone caracterizate de alopecie și cicatrice. Pentru a evalua leziunile incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

**Rezistența electrică transcutanată (RET):** măsură a impedanței electrice a pielii, exprimată ca valoare a rezistenței în kiloohmi. Este o metodă simplă și fiabilă de evaluare a funcției de barieră a pielii prin înregistrarea trecerii ionilor prin piele folosind o punte Wheatstone.

## 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Tabel 1

## Substanțe chimice de referință

| Denumire                      | Nr. EINECS | Nr. CAS    |                  |
|-------------------------------|------------|------------|------------------|
| 1,2-Diaminopropan             | 201-155-9  | 78-90-0    | Puternic coroziv |
| Acid acrilic                  | 201-177-9  | 79-10-7    | Puternic coroziv |
| 2-terț-butilfenol             | 201-807-2  | 88-18-6    | Coroziv          |
| Hidroxid de potasiu (10 %)    | 215-181-3  | 1310-58-3  | Coroziv          |
| Acid sulfuric (10 %)          | 231-639-5  | 7664-93-9  | Coroziv          |
| Acid octanoic (acid caprilic) | 204-677-5  | 124-07-02  | Coroziv          |
| 4-amino-1,2,4-triazol         | 209-533-5  | 584-13-4   | Necoroziv        |
| Eugenol                       | 202-589-1  | 97-53-0    | Necoroziv        |
| Fenetil bromură               | 203-130-8  | 103-63-9   | Necoroziv        |
| Tetracloretilenă              | 204-825-9  | 27-18-4    | Necoroziv        |
| Acid isostearic               | 250-178-0  | 30399-84-9 | Necoroziv        |
| 4-(metiltio)-benzaldehydă     | 222-365-7  | 3446-89-7  | Necoroziv        |

Majoritatea substanțelor chimice menționate sunt preluate din lista substanțelor chimice selectate pentru studiul internațional de validare ECVAM (4). Selectarea lor are la bază următoarele criterii:

- (i) număr egal de substanțe corozive și necorozive;

**▼B**

- (ii) substanțe disponibile pe piață, acoperind majoritatea claselor de substanțe chimice relevante;
- (iii) includerea substanțelor puternic corozive, precum și a celor mai puțin corozive pentru a permite diferențierea bazată pe puterea de corodare;
- (iv) selectarea substanțelor chimice care pot fi manipulate în laborator fără expunere la alte pericole grave în afară de coroziune.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța testului este aplicată o perioadă de până la 24 de ore pe suprafețele epidermice ale discurilor de piele într-un sistem de testare cu două compartimente, în care discurile de piele funcționează ca separație între compartimente. Discurile de piele sunt prelevate de la șobolani cu vârsta de 28-30 de zile, eutanasiați fără durere. Materialele corozive sunt identificate după capacitatea lor de a produce o pierdere a integrității normale a stratului cornos și a funcției de barieră, care este măsurată ca o micșorare a RET sub nivelul de prag (12). Pentru testarea RET a pielii de șobolan a fost aleasă o valoare-limită de 5 kΩ, pe baza numeroaselor date referitoare la o gamă largă de substanțe chimice, în care marea majoritate a valorilor au fost în mod clar cu mult peste (deseori > 10 kΩ) sau cu mult sub (deseori < 3 kΩ) această valoare (12). În general, materialele care sunt necorozive pentru animale, dar sunt iritante sau neiritante, nu reduc RET sub această valoare-limită. Mai mult decât atât, utilizarea altor preparate de piele sau a altor echipamente poate modifica valoarea-limită, necesitând o validare ulterioară.

În procedura de testare este introdusă o etapă de fixare a unui colorant pentru testarea de confirmare a rezultatelor pozitive ale RET care prezintă valori apropiate de 5 kΩ. Această etapă de fixare a unui colorant determină dacă creșterea permeabilității ionice are loc datorită distrugerii fizice a stratului cornos. Metoda RET, în care s-a utilizat piele de șobolan, s-a demonstrat a fi anticipativă pentru corozivitatea *in vivo* la iepure, evaluată prin metoda de testare B.4 (2). Trebuie subliniat că testarea *in vivo* pe iepuri este mult mai conservatoare în ceea ce privește corozivitatea și iritația cutanată în comparație cu testarea pe un eșantion de piele umană (15).

#### 1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

##### 1.5.1. Animale

Șobolani sunt speciile alese deoarece sensibilitatea pielii lor la substanțele chimice utilizate pentru acest test a fost demonstrată anterior (10). Vârsta (la care pielea este prelevată) și specia șobolanului sunt extrem de importante pentru a se asigura că foliculii piloși sunt în stare latentă, înainte să înceapă creșterea părului adult.

## ▼B

Părul dorsal și de pe coaste al șobolanilor tineri de aproximativ 22 de zile, femele sau masculi (specia Wistar – comparabilă sau derivată), este îndepărtat cu grijă cu un clește mic. Apoi animalele sunt spălate prin ștergere atentă, în timp ce zona fără păr este cufundată într-o soluție cu antibiotic (care conține de exemplu streptomycină, penicilină, cloramfenicol și amfotericin cu concentrații eficiente pentru inhibarea creșterii bacteriilor). Animalele sunt spălate încă o dată cu antibiotic în a treia sau a patra zi după prima spălare și sunt folosite în termen de trei zile după a doua spălare, atunci când stratul cornos s-a refăcut după îndepărtarea părului.

#### 1.5.2. Pregătirea discurilor de piele

Animalele sunt eutanasiate fără durere la vârsta de 28-30 de zile, această vârstă fiind deosebit de importantă. Se îndepărtează pielea dorso-laterală a fiecărui animal și se desprinde grăsimea subcutanată în exces prin jupuirea cu grijă a acesteia de pe piele. Se prelevează discuri de piele cu un diametru de aproximativ 20 mm fiecare. Pielea poate fi păstrată înainte ca discurile să fie folosite, în cazurile în care se demonstrează că datele de control negative și pozitive sunt echivalente cu cele obținute cu pielea proaspătă.

Fiecare disc de piele este așezat peste un capăt al unui tub PTFE (politetrafluoretilenă), asigurându-se că suprafața epidermei se află în contact cu tubul. Peste capătul tubului se așează prin apăsare un inel de cauciuc „O” pentru a fixa pielea, iar excesul de țesut este tăiat. Dimensiunile tubului și ale inelului „O” sunt prezentate în figura 2. Apoi inelul de cauciuc „O” este etanșat cu grijă la capătul tubului PTFE cu vaselină. Tubul este susținut de o clemă elastică în interiorul unei camere recipient care conține soluție de  $\text{MgSO}_4$  (154 mM) (figura 1). Discul de piele trebuie scufundat în întregime în soluția de  $\text{MgSO}_4$ . Dintr-o singură piele de șobolan se pot obține 10-15 discuri de piele.

Înainte de începerea testării se măsoară rezistența electrică a două discuri de piele din fiecare piele de animal ca o procedură de control al calității. Ambele discuri ar trebui să aibă valorile rezistenței mai mari de 10 k $\Omega$  pentru ca restul discurilor să poată fi folosite pentru test. Dacă valoarea rezistenței este mai mică de 10 k $\Omega$ , discurile rămase din pielea respectivă trebuie eliminate.

#### 1.5.3. Aplicarea substanțelor de testare și de control

Pentru fiecare studiu ar trebui efectuate controale pozitive și negative simultane pentru a se asigura realizarea corespunzătoare a modelului experimental. Ar trebui folosite discuri de piele de la un singur animal. Substanțele de control pozitiv și negativ propuse sunt acid clorhidric 10 M și, respectiv, apă distilată.

Substanțele lichide de testare (150  $\mu\text{l}$ ) sunt aplicate uniform pe suprafața epidermei din interiorul tubului. Atunci când se testează substanțe solide, pe disc se aplică o cantitate suficientă din substanța solidă, astfel încât întreaga suprafață a epidermei să fie acoperită. Peste substanța solidă se adaugă apă deionizată (150  $\mu\text{l}$ ), iar tubul este agitat ușor. Pentru a se obține un contact maxim cu pielea, substanțele solide ar trebui încălzite la 30 °C pentru ca substanțele de testare să se topească sau să se înmoaie sau ar trebui să fie măcinate pentru a se obține granule sau pulbere.



## ▼B

Pentru fiecare test și fiecare substanță de testare se utilizează trei discuri de piele. Substanțele de testare sunt aplicate timp de 24 de ore la o temperatură 20-23 °C, apoi se îndepărtează complet prin spălare cu jet de apă de la robinet, la maximum 30 °C.

#### 1.5.4. Măsurători ale RET

Impedanța pielii, respectiv RET, se măsoară utilizând o punte Wheatstone (13) în curent alternativ de tensiune joasă care prezintă următoarele caracteristici: tensiunea de lucru 1-3 V, curent alternativ sinusoidal sau dreptunghiular de 50-1 000 Hz și un interval de măsurare de cel puțin 0,1-30 kΩ. Puntea folosită în studiul de validare măsoară inductanța, capacitatea electrică și rezistența până la valori de 2 000 H, 2 000 μF și 2 MΩ la frecvențe de 100 Hz sau 1 KHz, utilizând valori în serie sau în paralel. Măsurările testului de corozivitate RET constau în înregistrarea rezistenței la o frecvență de 100 Hz utilizând valori în serie. Înainte de măsurarea rezistenței electrice, se micșorează tensiunea suprafeței pielii prin adăugarea unui volum suficient de etanol 70 % pentru a acoperi epiderma. După câteva secunde etanolul este îndepărtat din tub și apoi țesutul este hidratat prin adăugarea de 3 ml soluție MgSO<sub>4</sub> (154 mM). Electrozii punții sunt așezați pe ambele părți ale discului de piele pentru a măsura rezistența în kΩ/disc de piele (figura 1). Dimensiunile electrozilor și lungimea electrodului expus sub clemele-crocodil sunt prezentate în figura 2. În timpul măsurării rezistenței, clema atașată electrodului interior este așezată pe partea superioară a tubului PTFE pentru a se asigura că lungimea electrodului scufundat în soluția de MgSO<sub>4</sub> rămâne constantă. Electrocul exterior este introdus în interiorul compartimentului receptor astfel încât să se sprijine pe fundul compartimentului. Distanța dintre clema elastică și fundul tubului PTFE este menținută constantă (figura 2) deoarece această distanță influențează valoarea rezistenței obținute. Prin urmare, distanța dintre electrodul interior și discul de piele trebuie să fie constantă și minimă (1-2 mm).

Dacă valoarea rezistenței măsurate este mai mare de 20 kΩ, acest lucru se poate datora resturilor de substanță de testare care acoperă suprafața epidermică a discului de piele. Se poate încerca o îndepărtare suplimentară a acesteia, de exemplu prin etanșarea tubului PTFE cu degetul mare protejat și agitarea acestuia timp de aproximativ 10 secunde; soluția de MgSO<sub>4</sub> este înlăturată și se repetă măsurarea rezistenței cu MgSO<sub>4</sub> proaspăt.

Proprietățile și dimensiunile aparatului de testare și ale procedurii de testare utilizate pot influența valorile RET obținute. Pe baza datelor obținute utilizând aparatul specific și procedura descrisă în această metodă, s-a stabilit un prag de corozivitate de 5 kΩ. Dacă se modifică condițiile de testare sau dacă se folosește un alt aparat, valorile de control și de prag pot fi diferite. Prin urmare, este necesar să se etaloneze metodologia și valorile de prag ale rezistenței prin testarea unei serii de substanțe de referință alese dintre substanțele chimice utilizate pentru studiul de validare (4) (5) sau dintre clase de substanțe chimice similare cu substanțele chimice studiate. Tabelul 1 prezintă un set de substanțe chimice de referință adecvate.

**▼B****1.5.5. Metode de fixare a unui colorant**

Expunerea anumitor materiale necorozive poate duce la micșorarea rezistenței sub limita de 5 kΩ, permițându-se trecerea ionilor prin stratul cornos, ceea ce reduce rezistența electrică (5). De exemplu, substanțele chimice și substanțele organice neutre care au proprietăți de tensioactive (inclusiv detergenți, emulgatori și alți agenți tensioactivi) pot îndepărta lipidele pielii, făcând bariera cutanată mai permeabilă pentru ioni. Astfel, dacă în absența unei leziuni vizibile, valorile RET ale substanțelor de testare sunt de aproximativ 5 kΩ sau mai mici, ar trebui efectuată o evaluare a penetrării colorantului pentru țesuturile tratate și de control pentru a se determina dacă valorile RET obținute rezultă dintr-o permeabilitate cutanată mărită sau dintr-o coroziune cutanată (3) (5). Dacă este vorba de o coroziune, acolo unde stratul cornos este rupt, colorantul sulforhodamină B aplicat pe suprafața pielii penetrează rapid și colorează țesutul de dedesubt. Acest colorant special rămâne stabil la contactul cu o gamă largă de substanțe chimice și nu este influențat de procedura de extracție descrisă mai jos.

**1.5.5.1. Aplicarea și îndepărtarea colorantului sulforhodamină B**

După efectuarea măsurătorilor RET, sulfatul de magneziu este îndepărtat din tub, iar pielea este examinată cu atenție pentru a se depista deteriorări evidente. Dacă nu există nicio deteriorare majoră clară, 150 μl de substanță diluată de 10 % (greutate/volum) în apă distilată de sulforhodamină B (Acid roșu 52; C.I. 45100; număr EINECS 222-529-8; număr CAS 3520-42-1), este aplicată pe suprafața epidermică a fiecărui disc de piele timp de 2 ore. Ulterior, aceste discuri de piele sunt spălate cu apă de la robinet la temperatura camerei, timp de aproximativ 10 secunde, pentru a îndepărta colorantul în exces/nefixat. Fiecare disc de piele este scos cu atenție din tubul PTFE și așezat într-o fiolă (de exemplu o fiolă de sticlă cu scintilație de 20 ml) care conține apă deionizată (8 ml). Fiolele sunt agitate ușor timp de 5 minute pentru a se îndepărta orice cantitate de colorant nefixat. Se repetă procedura de spălare, după care discurile de piele sunt scoase și așezate în fiole care conțin 5 ml de dodecilsulfat de sodiu (SDS) 30 % (greutate/volum) în apă distilată și incubate la 60 °C în timpul nopții.

După incubare, fiecare disc de piele este scos și eliminat, iar soluția rămasă este centrifugată timp de 8 minute la 21 °C (forța centrifugală relativă ~ 175 × g). Un eșantion de supernatant de 1 ml este diluat într-o proporție de 1 la 5 (volum/volum) [și anume 1 ml + 4 ml] cu SDS 30 % (greutate/volum) în apă distilată. Densitatea optică (DO) a soluției este măsurată la 565 nm.

**1.5.5.2. Calcularea conținutului de colorant**

Conținutul de colorant sulforhodamină B al fiecărui disc este calculat plecând de la valorile DO (5) (coeficient molar de extincție al colorantului sulforhodamină B la 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ ; greutate moleculară = 580). Conținutul de colorant este determinat pentru fiecare disc de piele folosind o curbă caracteristică de etalonare, iar ulterior se calculează conținutul mediu de colorant pentru testele repetate.

**2. DATE**

Acolo unde este necesar, valorile rezistenței (kΩ) și valorile conținutului mediu de colorant (μg/disc), pentru materialul de testare, precum și pentru controalele pozitive și negative, ar trebui prezentate sub formă de tabel (date individuale de testare și mediile ± DT), inclusiv date pentru mostre/teste repetate, valori medii și individuale.

**▼B**

## 2.1. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Valorile medii ale RET sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor pozitive și negative efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metoda în laboratorul de testare. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele acceptabile ale rezistenței sunt prezentate în următorul tabel:

| Control | Substanță               | Interval de rezistență (kΩ) |
|---------|-------------------------|-----------------------------|
| Pozitiv | Acid clorhidric 10 moli | 0,5-1,0                     |
| Negativ | Apă distilată           | 10-25                       |

Valorile medii de fixare ale colorantului sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metodă. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele propuse pentru conținutul acceptabil de colorant pentru substanțele de control sunt prezentate mai jos:

| Control | Substanță               | Interval pentru conținutul de colorant (μg/disc) |
|---------|-------------------------|--|
| Pozitiv | Acid clorhidric 10 moli | 40-100   |
| Negativ | Apă distilată           | 15-35  |

Se consideră că substanța de testare nu este corozivă pentru piele:

- (i) dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța de testare este mai mare de 5 kΩ; sau
- (ii) dacă valoarea medie a RET este mai mică sau egală cu 5 kΩ; și

— discul de piele nu prezintă vreo leziune evidentă; și

— conținutul mediu de colorant al discului este mult inferior conținutului mediu de colorant al discului de control pozitiv (HCl 10 moli) obținut în paralel.

Se consideră că substanța de testare este corozivă pentru piele:

- (i) dacă valoarea medie a RET este mai mică sau egală cu 5 kΩ și discul de piele este evident deteriorat; sau
- (ii) dacă valoarea medie a RET este mai mică sau egală cu 5 kΩ; și

— discul de piele nu prezintă vreo leziune evidentă; dar

— conținutul mediu de colorant al discului este mai mare sau egal cu conținutul mediu de colorant al discului de control pozitiv (HCl 10 moli) obținut în paralel.

**▼B****3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțe de testare și control:

- numele substanțelor chimice, precum numele IUPAC sau CAS și număr CAS, dacă este cunoscut;
- puritatea și compoziția substanței sau a preparatului [în procent(e) pe greutate] și starea fizică;
- proprietăți fizico-chimice relevante pentru efectuarea studiului, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, solubilitatea în apă;
- tratamentul aplicat substanțelor de testare/control înainte de testare, după caz (de exemplu încălzire, măcinare);
- stabilitate, dacă este cunoscută.

Animale testate:

- specia și sexul animalului utilizat;
- vârsta animalelor în momentul prelevării pielii;
- sursa, condițiile de viață, dieta etc.;
- detalii privind pregătirea pielii.

Condiții de testare:

- curbe de etalonare pentru aparatele de testare;
- curbe de etalonare pentru desfășurarea testului cu fixarea colorantului;
- detalii ale procedurii de testare utilizate pentru măsurările RET;
- detalii ale procedurii de testare utilizate pentru evaluarea fixării colorantului, după caz;
- descrierea oricărei modificări a procedurilor de testare;
- descrierea criteriilor de evaluare utilizate.

Rezultate:

- prezentarea sub formă de tabel a datelor obținute în urma testării RET și testului de fixare a colorantului (după caz) pentru fiecare animal și fiecare mostră de piele;
- descrierea tuturor efectelor observate.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OCDE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OCDE Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.OECD.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.OECD.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

## ▼B

2. Metoda de testare B.4. Toxicitate acută: iritație/coroziune dermică.
3. Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.
4. Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., and Worth, A. P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *in Vitro* 12, 471-482.
5. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *in Vitro* 12, 483-524.
6. OCDE (1996). Final Report of the OCDE Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillozo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>
9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epis\\_brd.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epis_brd.pdf).
11. OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27<sup>th</sup> March 2002, OCDE ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
12. Oliver, G. J. A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modification and validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.

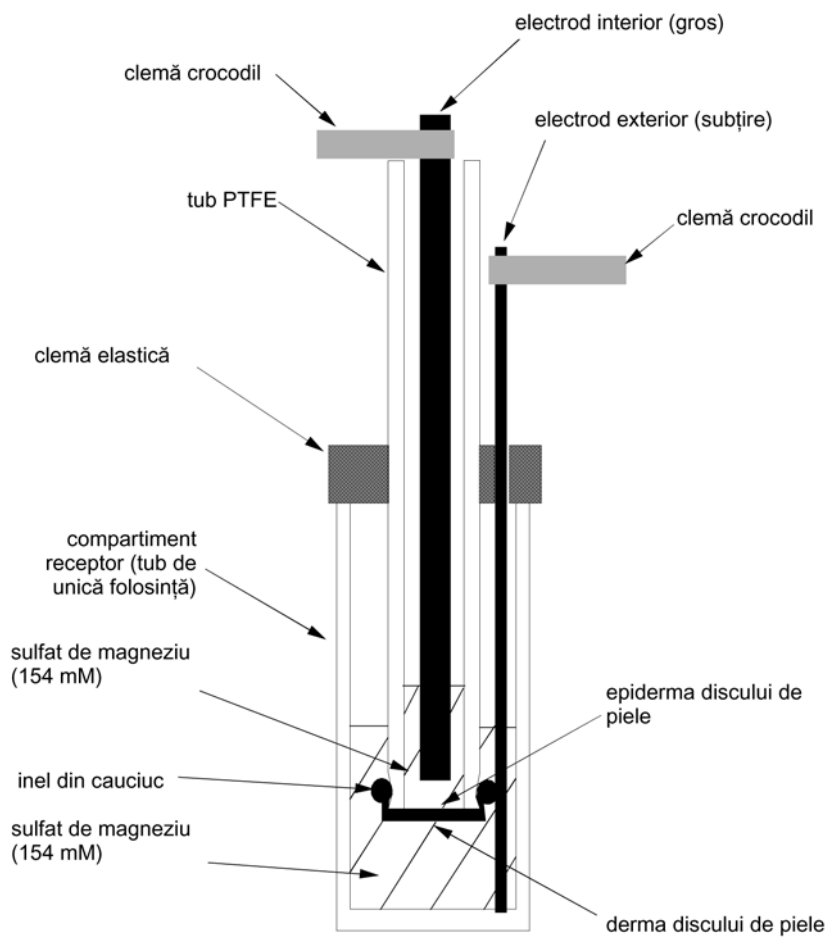
**▼B**

13. Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxic. in Vitro* 6, 191-194.
14. Worth A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdaile D. J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OCDE Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709-720.
15. Basketter, D. A., Chamberlain, M., Griffiths, H. A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845-852.
16. Oliver G. J. A., Pemberton M. A. and Rhodes C. (1988). An *In Vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic. in Vitro.* 2, 7-17.

▼ B

Figura 1

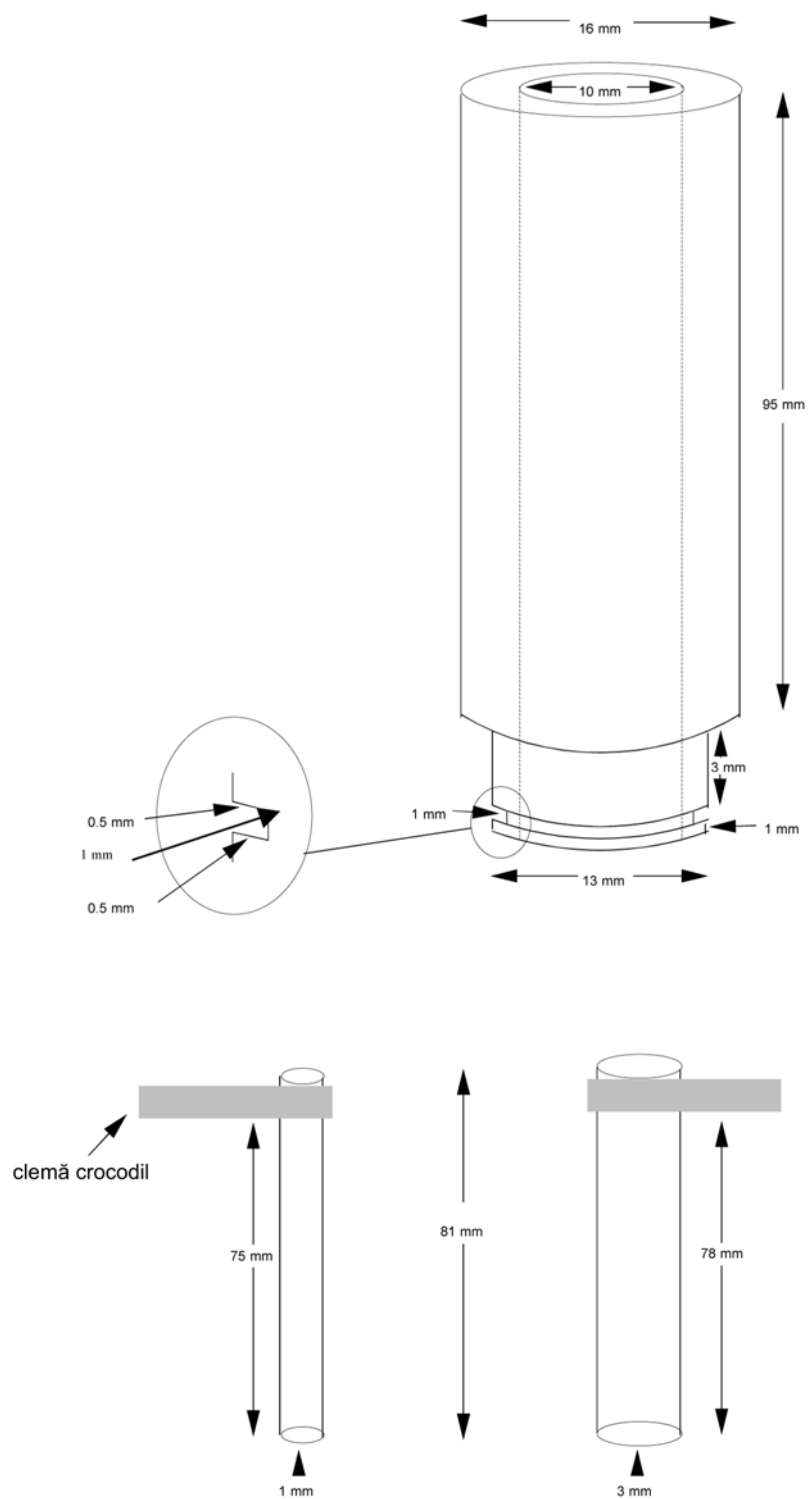
## Aparatura pentru testarea RET pe pielea de șobolan



▼ B

Figura 2

Dimensiunile tubului de politetrafluoretilenă (PFTE) și a tuburilor receptoare și a electrozilor utilizați





**▼B****Factori importanți ai aparatului prezentat mai sus:**

- diametrul interior al tubului PFTE;
- lungimea electrozilor în raport cu tubul PFTE și tubul receptor, astfel încât discul de piele să nu fie atins de electrozi, iar lungimea standard a electrodului să fie în contact cu soluția de  $\text{MgSO}_4$ ;
- cantitatea de soluție de  $\text{MgSO}_4$  din tubul receptor trebuie să fie suficientă pentru ca adâncimea lichidului, în raport cu nivelul din tubul PFTE, să fie astfel cum se indică în figura 1;
- discul de piele ar trebui fixat de tubul PFTE suficient de bine, astfel încât rezistența electrică să fie o măsură reală a proprietăților pielii.

**▼B****B.40 BIS. COROZIUNEA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTARE PE UN MODEL DE PIELE UMANĂ****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 431 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Coroziunea cutanată se referă la producerea unei vătămări ireversibile a țesuturilor pielii în urma aplicării unei substanțe de testare [definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor și amestecurilor chimice (GHS)] (1). Această metodă de testare prevede o procedură de evaluare a corozivității cutanate care nu se efectuează pe animale vii sau piele animală.

Evaluarea corozivității cutanate implică în mod obișnuit utilizarea animalelor de laborator (2). Preocuparea pentru durerea și suferința pe care această metodă le implică s-a concretizat în revizuirea metodei de testare B.4 care permite determinarea nivelului de coroziune cutanată utilizând metode alternative, *in vitro*, prin care se evită provocarea durerii și suferinței animalelor.

O primă etapă către definirea unor teste alternative, care ar putea fi utilizate pentru testarea corozivității cutanate în vederea reglementării acestora, a constat în efectuarea de studii de prevalidare (3). În urma acestora, s-a efectuat un studiu formal de validare (6) (7) (8) a metodelor *in vitro* pentru evaluarea corozivității pielii (4) (5). Rezultatele acestor studii și al literaturii de specialitate publicate (9) au arătat că testele următoare ar putea fi utilizate pentru evaluarea *in vivo* a corozivității cutanate (10) (11) (12) (13): testarea pe un model de piele umană (prezenta metodă) și testul rezistenței electrice transcutanate (metoda de testare B.40).

Studiile de validare au arătat că testele care implică folosirea modelelor de piele umană (3) (4) (5) (9) pot face distincția, într-o manieră fiabilă, între substanțele corozive și necorozive pentru pielea cunoscute. Protocolul de testare poate furniza, de asemenea, un indicator pentru distincția între substanțele puternic corozive și substanțele mai puțin corozive.

Testul descris în prezenta metodă permite identificarea substanțelor și amestecurilor chimice corozive. În egală măsură, acesta permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive pe baza unor alte elemente de determinare, folosind alte informații existente (de exemplu pH-ul, relații structură-activitate, date despre om și/sau animal) (1) (2) (13) (14). În mod normal nu furnizează informații cu privire la iritațiile cutanate și nici nu permite subclasificarea substanțelor corozive conform Sistemului global armonizat de clasificare (GHS) (1).

Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere, se recomandă strategia de testare secvențială anexată la metoda de testare B.4 (2) și prevăzută în Sistemul global armonizat de clasificare (GHS) (1). Această strategie de testare include efectuarea de teste *in vitro* pentru coroziunea cutanată (așa cum sunt descrise în prezenta metodă) și pentru iritarea cutanată, înainte de a se lua în considerare testarea pe animale vii.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Coroziune cutanată *in vivo*:** producerea unei vătămări ireversibile a pielii, și anume necroza vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe de testare pentru o durată de până la patru ore. Reacțiile corozive sunt caracterizate de ulceratii, sângerări, cruste însângerate și, la sfârșitul perioadei de observare de 14 zile, decolorare datorată albirii pielii, zone caracterizate de alopecie și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

**Viabilitate celulară:** parametru care măsoară activitatea unei populații celulare (de exemplu capacitatea dehidrogenazei mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT), care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor.

## 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Tabel 1

## Substanțe chimice de referință

| Denumire                      | Nr. EINECS | Nr. CAS    |                  |
|-------------------------------|------------|------------|------------------|
| 1,2-Diaminopropan             | 201-155-9  | 78-90-0    | Puternic coroziv |
| Acid acrilic                  | 201-177-9  | 79-10-7    | Puternic coroziv |
| 2-terț-butilfenol             | 201-807-2  | 88-18-6    | Coroziv          |
| Hidroxid de potasiu (10 %)    | 215-181-3  | 1310-58-3  | Coroziv          |
| Acid sulfuric (10 %)          | 231-639-5  | 7664-93-9  | Coroziv          |
| Acid octanoic (acid caprilic) | 204-677-5  | 124-07-02  | Coroziv          |
| 4-Amino-1,2,4-triazol         | 209-533-5  | 584-13-4   | Necoroziv        |
| Eugenol                       | 202-589-1  | 97-53-0    | Necoroziv        |
| Fenetil bromură               | 203-130-8  | 103-63-9   | Necoroziv        |
| Tetracloretilenă              | 204-825-9  | 27-18-4    | Necoroziv        |
| Acid isostearic               | 250-178-0  | 30399-84-9 | Necoroziv        |
| 4-(metiltio)-benzaldehydă     | 222-365-7  | 3446-89-7  | Necoroziv        |

Majoritatea substanțelor chimice menționate sunt preluate din lista substanțelor chimice selectate pentru studiul internațional de validare ECVAM (4). Selectarea lor se bazează pe următoarele criterii:

- (i) număr egal de substanțe corozive și necorozive;
- (ii) substanțe disponibile pe piață, acoperind majoritatea claselor de substanțe chimice relevante;
- (iii) includerea substanțelor puternic corozive, precum și a celor mai puțin corozive pentru a permite diferențierea bazată pe potențialul coroziv;

**▼B**

- (iv) selectarea substanțelor care pot fi manipulate în laborator fără expunere la alte pericole grave în afară de coroziune.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Materialul de testare se aplică local pe un model tridimensional de piele umană, conținând cel puțin epidermă reconstruită cu un strat cornos funcțional. Materialele corozive sunt identificate în funcție de capacitatea de a produce scăderea viabilității celulare [determinată, de exemplu, prin metoda de reducere MTT (15)] sub nivelele definite pentru perioadele de expunere specificate. Principiul testului pe piele umană se bazează pe ipoteza că substanțele chimice corozive sunt capabile să penetreze stratul cornos prin difuziune sau eroziune și sunt citotoxice până la nivelul epidermei inferioare.

#### 1.4.1. Procedura

##### 1.4.1.1. *Modele de piele umană*

Modelele din piele umană pot fi construite sau obținute pe cale comercială (de exemplu modelele EpiDerm<sup>TM</sup> și EPISKIN<sup>TM</sup>) (16) (17) (18) (19) sau pot fi dezvoltate sau construite în laboratorul de testare (20) (21). Se admite că utilizarea pielii umane este subiectul considerațiilor și condițiilor etice la nivel național și internațional. Orice nou model ar trebui validat (cel puțin în înțelesul descris la punctul 1.4.1.1.2). Modelele de piele umană utilizate pentru acest test trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

##### 1.4.1.1.1. Condiții generale ale modelului

Pentru construcția epiteliului trebuie utilizate cheratinocite umane. Sub stratul cornos funcțional trebuie incluse mai multe straturi de celule epiteliale viabile. Modelul de piele poate avea, de asemenea, un strat component stromal. Stratul cornos ar trebui să fie multistratificat, cu profilul lipidic necesar pentru a produce o barieră funcțională suficient de robustă care să reziste penetrării rapide a marcatorelor citotoxici. Proprietățile de conținut ale modelului trebuie să prevină trecerea substanței de stratul cornos către țesutul viabil. Trecerea substanțelor chimice de stratul cornos va determina o slabă prezentare a expunerii pielii. Modelul de piele nu trebuie să fie contaminat cu bacterii (inclusiv micoplasmă) sau ciuperci.

##### 1.4.1.1.2. Condiții funcționale ale modelului

Amplitudinea viabilității este cuantificată, de obicei, utilizând MTT sau alți coloranți vitali convertiți metabolic. În aceste cazuri, densitatea optică (DO) a colorantului (solubilizat) extras din țesutul negativ de control trebuie să fie de cel puțin 20 de ori mai mare decât densitatea optică a solventului extras [pentru rezumat, a se vedea (22)]. Țesutul negativ de control trebuie să fie stabil în cultură (să furnizeze măsurători ale viabilității similare) pentru durata perioadei de expunere la testare. Stratul cornos trebuie să fie suficient de robust pentru a rezista la penetrarea rapidă a anumitor marcatore citotoxici chimici (ex. 1 % Triton X-100). Această proprietate poate fi estimată prin timpul de expunere necesar pentru a reduce viabilitatea celulei cu 50 % (ET<sub>50</sub>) (de exemplu pentru modelele EpiDerm<sup>TM</sup> și EPISKIN<sup>TM</sup> acesta este > 2 ore) Țesutul trebuie să poată fi reprodus în timp și de preferat între laboratoare diferite. Mai mult decât atât, acesta ar trebui să fie capabil să estimeze potențialul coroziv al substanțelor chimice de referință (a se vedea tabelul 1) atunci când se utilizează în cadrul protocolului de testare selectat.

**▼B****1.4.1.2.     *Aplicarea testului și a substanțelor de control***

Se folosesc două mostre de țesut pentru fiecare tratament (perioada de expunere), incluzând controalele. În cazul substanțelor lichide, trebuie aplicată o cantitate suficientă de substanță de testare pentru a acoperi toată suprafața de piele în mod uniform: trebuie utilizat un minimum de 25  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . În cazul substanțelor solide, trebuie aplicată o cantitate suficientă de substanță de testare, în mod egal pe toată suprafața și trebuie hidratată cu apă distilată sau deionizată pentru a asigura un contact bun cu pielea. Atunci când este necesar, substanțele solide trebuie transformate în pudră înainte de aplicare. Metoda de aplicare trebuie selectată în funcție de substanța chimică de testare (a se vedea, de exemplu, substanța de referință 5). La sfârșitul perioadei de expunere, substanța de testare trebuie spălată cu atenție de pe suprafața de piele, utilizând o soluție-tampon adecvată sau 0,9 % NaCl.

Pentru fiecare studiu trebuie utilizate controale pozitive sau negative concomitente pentru a asigura calitatea rezultatelor modelului experimental. Substanțele recomandate pentru controlul pozitiv sunt acidul acetic glacial sau 8N KOH. Substanțele recomandate pentru controlul negativ sunt 0,9 % NaCl sau apă.

**1.4.1.3.     *Măsurători ale viabilității celulare***

Pentru măsurarea viabilității celulare trebuie folosite numai metode cantitative validate. În plus, măsurarea viabilității trebuie să fie compatibilă cu utilizarea pe un țesut tridimensional. Fixarea nespecifică a colorantului nu trebuie să interfereze cu măsurarea viabilității. De asemenea, nu sunt adecvați coloranții care se fixează prin utilizarea unei proteine și aceia care nu sunt supuși unei conversii metabolice (de exemplu roșul neutru). Produsul cel mai frecvent utilizat este MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazoliu, tiazolul albastru: nr. EINECS 206-069-5, nr. CAS 298-93-1], care a demonstrat rezultate clare și reproductibile (5), dar se pot utiliza și alte produse. Mostra de piele este introdusă într-o soluție MTT de concentrație potrivită (de exemplu 0,3-1 mg/ml) la o temperatură de incubație adecvată, timp de 3 ore. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras utilizând un solvent (izopropanol) și concentrația acestuia se măsoară determinând densitatea optică la o lungime de undă cuprinsă între 540 și 595 nm.

Acțiunea chimică a substanței de testare asupra colorantului vital poate imita acțiunea metabolismului celular, determinând o falsă estimare a viabilității. S-a demonstrat că acest fenomen apare atunci când substanța de testare nu este complet eliminată prin spălare de pe suprafața pielii (9). Dacă substanța de testare acționează direct asupra colorantului, trebuie efectuate controale suplimentare pentru a detecta și corecta interferențele substanței de testare cu măsurarea viabilității (9) (23).

**2.           DATE**

Pentru fiecare țesut, trebuie raportate sub formă de tabel valorile densității optice și procente calculate ale viabilității celulare pentru substanța de testare, precum și controalele negative și pozitive, inclusiv datele obținute din testele repetate, valorile medii și individuale.

**▼B****2.1. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Valorile densității optice obținute pentru fiecare mostră pot fi utilizate pentru a calcula un procent de viabilitate relativ la controlul negativ, care este stabilit, în mod arbitrar, la 100 %. Este necesar să se definească în mod clar și documentat, precum și să se demonstreze, caracterul compatibil al valorii prag a procentului de viabilitate celulară care diferențiază substanțele corozive de cele necorozive (sau diferențiază diferitele clase de substanțe corozive) sau al procedurii (procedurilor) statistice utilizate pentru evaluarea rezultatelor și identificarea materialelor corozive. În general, aceste valori sunt stabilite în timpul etapei de optimizare a testării, controlate în faza de prevalidare și confirmate într-un studiu de validare. De exemplu, evaluarea corozivității asociate cu modelul EpiDerm<sup>TM</sup> este (9):

Substanța testată este considerată corozivă în contact cu pielea:

- (i) dacă viabilitatea este mai mică de 50 % după 3 minute de expunere; sau
- (ii) dacă viabilitatea este mai mare sau egală cu 50 % după 3 minute de expunere, respectiv mai mică de 15 % după 1 oră de expunere.

Substanța testată este considerată necorozivă în contact cu pielea:

- (i) dacă viabilitatea este mai mare sau egală cu 50 % după 3 minute de expunere, respectiv mai mare sau egală de 15 % după 1 oră de expunere.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțe testate și de control:

- denumire chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS și numărul CAS, dacă se cunosc;
- puritatea și compoziția substanței sau a preparatului [în procent(e) per greutate];
- proprietăți fizico-chimice, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;
- tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu încălzire, măcinare);
- stabilitate, dacă este cunoscută.

Justificarea modelului de piele și a protocolului utilizat.

Condiții de testare

- sistem celular utilizat;
- informații de calibrare pentru instrumentul de măsurare a viabilității celulare (de exemplu spectrofotometru);

**▼B**

- informații complete privind modelul de piele utilizat, inclusiv validitatea acestuia;
- detalii cu privire la procedura de testare utilizată;
- dozaje utilizate în testare;
- descrierea oricărei modificări a procedurii de testare;
- referințe la istoricul modelului;
- descrierea criteriilor de evaluare folosite.

## Rezultate:

- prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute cu fiecare mostră de testare;
- descrierea altor efecte observate.

## Discutarea rezultatelor.

## Concluzie.

## 4.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OCDE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OCDE Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.Ocde.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.Ocde.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).
2. Metoda de testare B.4. Toxicitate acută: iritație/coroziune dermică.
3. Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Poniec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.
4. Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., and Worth, A. P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.
5. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483-524.
6. OCDE (1996). Final Report of the OCDE Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.

## ▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J. P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H. G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.
10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.
12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm<sup>TM</sup>, EPISKIN<sup>TM</sup> (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis\\_brd.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf).
13. OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27<sup>th</sup> March 2002, OCDE ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
14. Worth A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OCDE Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.
15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65, 55-63.
16. Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. *In Vitro* 8, 889-891.
17. Ponc, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.
18. Tinois E., Gaetani Q., Gayraud B., Dupont D., Rougier A., Pouradier D.X. (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140
19. Tinois E., Tiollier J., Gaucherand M., Dumas H., Tardy M., Thivolet J. (1991). *In vitro* and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319
20. Parentau, N. L., Bilbo, P., Molte, C. J., Mason, V. S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.
21. Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., Parentau, N. L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.



**▼B**

22. Marshall, N. J., Goodwin, C. J., Holt, S. J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5, 69-84.
23. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J. J. M., and Botham, P. A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxic. InVitro* 15, 57-93.

**▼B****B.41. TESTUL DE FOTOTOXICITATE 3T3 NRU *IN VITRO*****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 432 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Fototoxicitatea se definește ca o reacție toxică datorată aplicării unei substanțe pe corp, declanșată sau accentuată (și vizibilă în cazul unor doze mici) după o expunere ulterioară la lumină sau indusă prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unei substanțe.

Testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* se folosește pentru identificarea potențialului fototoxic al unei substanțe testate, indus de substanța chimică după expunerea la lumină. Testul evaluează fototoxicitatea prin reducerea relativă a viabilității celulelor expuse la substanța respectivă în prezența sau în absența luminii. Substanțele identificate prin acest test pot fi fototoxice *in vivo* după aplicare sistemică și distribuție în piele sau după aplicare locală.

S-au semnalat efecte fototoxice pentru multe tipuri de substanțe chimice (1) (2) (3) (4). Trăsătura comună a acestor substanțe este capacitatea de a absorbi energia luminoasă din gama luminii solare. Conform primei legi din fotochimie (legea lui Grotthaus-Draper), reacția fotochimică necesită absorbția unui număr suficient de cuante de lumină. Astfel, înainte de a se avea în vedere realizarea unui test biologic, se recomandă determinarea unui spectru de absorbție UV/vizibil a produsului chimic analizat, conform liniei directe 101 a OCDE pentru teste. În cazul în care un coeficient de extincție/absorbție molară este mai mic de  $10 \text{ litri} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , acel produs chimic nu deține potențial fotoreactiv. Nu este necesar ca un astfel de produs chimic să fie supus testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* sau oricărui alt test biologic destinat detectării efectelor fotochimice adverse (1) (5). A se vedea, de asemenea, apendicele 1.

Importanța și fiabilitatea testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* au fost evaluate recent (6) (7) (8) (9). S-a dovedit că testul de fototoxicitate 3T3 NRU oferă posibilitatea de a anticipa efectele fototoxicității acute *in vivo* la oameni și animale. Testul nu este destinat să anticipeze alte efecte adverse care ar putea apărea în urma acțiunii combinate a unui produs chimic și a luminii, precum fotogenotoxicitatea, fotoalergia și fotocancerigenitatea și nici nu evaluează puterea fototoxică. În plus, testul nu este conceput pentru a determina mecanismele indirecte ale fototoxicității, efectele metabolitelor substanței de testare sau efectele amestecurilor.

În timp ce utilizarea sistemelor de metabolizare este o cerință generală pentru toate testele *in vitro* utilizate pentru estimarea potențialului genotoxic și cancerigen, până în prezent, în cazul fototoxicologiei, se cunosc puține exemple în care este necesară o transformare metabolică, astfel încât substanța chimică să acționeze ca o fototoxină *in vivo* sau *in vitro*. Astfel, efectuarea prezentului test cu un sistem de activare metabolică nu se consideră nici necesară și nici nu se justifică din punct de vedere științific.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Iradianță:** intensitatea luminii ultraviolete (UV) sau vizibile, incidente pe o suprafață, măsurată în  $\text{W/m}^2$  sau  $\text{mW/cm}^2$ .

**Doză de lumină:** cantitatea (= intensitate  $\times$  timp) de lumină ultravioletă (UV) sau vizibilă, incidentă pe o suprafață, exprimată în jouli (=  $\text{W} \times \text{s}$ ) pe unitate de suprafață, de exemplu  $\text{J/m}^2$  sau  $\text{J/cm}^2$ .

**Benzi de lungimi de undă a luminii UV:** specificațiile recomandate de CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) sunt: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) și UVC (100-280 nm). Se utilizează, de asemenea, și alte specificații: limita dintre UVB și UVA este plasată adesea la 320 nm, iar UVA se poate diviza în UV-A1 și UV-A2, cu o limită situată la aproximativ 340 nm.

**Viabilitate celulară:** parametru care măsoară întreaga activitate a unei populații celulare (de exemplu absorbția colorantului vital roșu neutru în lizozomii celulari), care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor.

**Viabilitate celulară relativă:** viabilitatea celulară exprimată în funcție de probele solvente (negative) prelevate pe toată durata realizării testului (fie + Irr, fie – Irr), dar care nu au fost tratate cu un produs chimic.

**PIF (Photo-Irritation Factor) (factor de fotoiritare):** factor obținut prin compararea a două concentrații citotoxice la fel de eficiente ( $\text{IC}_{50}$ ) ale produsului chimic testat obținute în absența (– Irr) și în prezența (+ Irr) unei iradiere necitotoxice cu lumină UV/vizibilă.

**$\text{IC}_{50}$ :** concentrația produsului chimic testat prin care viabilitatea celulară se reduce cu 50 %.

**MPE (Mean-Photo-Effect) (fotoefect mediu):** măsură rezultată din analiza matematică a două curbe concentrație-răspuns obținute în absența (– Irr) și în prezența (+ Irr) unei iradiere necitotoxice cu lumină UVA/vizibilă.

**Fototoxicitate:** reacție toxică acută care apare după o primă expunere a pielii la anumite produse chimice și expunere ulterioară la lumină sau care este indusă în mod similar prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unui produs chimic.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* se bazează pe o comparație a citotoxicității unui produs chimic atunci când este testat cu expunere sau fără expunere la o doză necitotoxică de lumină solară simulată. În prezentul test, citotoxicitatea se exprimă printr-o diminuare, în funcție de concentrație, a colorantului vital roșu neutru (NR) fixat (9) după 24 de ore de la tratarea cu produsul chimic testat și iradierea acestuia (10). Colorantul roșu neutru este un cation slab care penetrează imediat membranele celulare prin nedifuziune acumulându-se intracelular în lizozomi. Modificarea suprafeței sensibile a membranei lizozomilor duce la o fragilitate a acestora și la alte modificări care, gradual, devin ireversibile. Aceste schimbări produse de acțiunea xenobioticelor duc la o diminuare a fixării colorantului roșu neutru. Astfel, se poate face distincția între celulele viabile, deteriorate sau moarte, fapt ce reprezintă însăși fundamentul acestui test.

**▼B**

Celulele Balb/c 3T3 sunt păstrate în cultură timp de 24 ore pentru formarea monostraturilor. Pentru fiecare produs chimic testat, sunt preincubate două plăci cu 96 de godeuri, cu opt concentrații diferite ale substanței de testare, timp de 1 oră. Ulterior, una dintre cele două plăci este expusă la cea mai înaltă doză de iradiere necitotoxică, iar cealaltă placă se păstrează la întuneric. În ambele plăci, mediul de tratare este înlocuit, ulterior, cu mediul de cultură și după alte 24 de ore de incubare, se determină viabilitatea celulară prin fixarea colorantului roșu neutru. Viabilitatea celulară este exprimată în procent de probe martor solvente netratate și se calculează pentru fiecare concentrație de testare. Pentru estimarea potențialului fototoxic, se compară răspunsurile la concentrații, obținute în prezența și absența iradierii, de obicei la nivelul  $IC_{50}$ , respectiv la concentrația care reduce viabilitatea celulară cu 50 % față de probele martor netratate.

#### 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

##### 1.4.1. Etape pregătitoare

###### 1.4.1.1. Celule

În studiul de validare s-a utilizat o linie permanentă de celule fibroblaste de șoarece – Balb/c 3T3, clona 31 – provenind fie de la ATCC (American Type Culture Collection) Manassas, VA, SUA, fie de la ECACC (European Collection of Cell Cultures) Salisbury, Wiltshire, UK și, prin urmare se recomandă ca celulele să provină de la un depozit de celule calificat corespunzător. Dacă se adaptează condițiile de cultură la nevoile specifice ale celulelor, se pot utiliza cu succes alte celule sau linii celulare pentru aceeași procedură de testare, cu condiția demonstrării echivalenței.

Celulele trebuie controlate cu regularitate pentru a verifica absența contaminării acestora cu micoplasmă și trebuie utilizate numai dacă rezultatele acestui control sunt satisfăcătoare (11).

Este important ca sensibilitatea celulelor la UVA să fie controlată în mod regulat, conform procedurii pentru controlul calității descrisă în prezenta metodă. Datorită faptului că sensibilitatea celulelor la UVA poate să crească o dată cu numărul de reînsămânțări, ar trebui să se utilizeze celulele Balb/c 3T3 cu cel mai mic număr de reînsămânțări posibile, de preferință mai mic de 100 (a se vedea punctul 1.4.2.2.2 și apendicele 2).

###### 1.4.1.2. Medii și condiții de cultură

Se recomandă utilizarea unor medii de cultură și a unor condiții de incubare corespunzătoare pentru reînsămânțarea sistematică a celulelor și în timpul procedurii de testare. De exemplu, pentru celulele Balb/c 3T3, mediul de cultură este DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) la care s-a adăugat 10 % ser de vițel nou-născut, 4 mM de glutamină, penicilină (100 IU), și streptomycină (100  $\mu$ g/ml), incubarea în atmosferă umidificată la 37 °C, 5-7,5 %  $CO_2$ , în funcție de tampon (a se vedea punctul 1.4.1.4, al doilea paragraf). Este foarte important ca aceste condiții de cultură celulară să asigure o durată a ciclului celular într-un interval normal pentru celulele sau linia celulară utilizată.

###### 1.4.1.3. Pregătirea culturilor

Celulele din stocul de culturi congelate se însămânțează într-un mediu de cultură la o densitate corespunzătoare și se reînsămânțează cel puțin o dată înainte de a fi folosite pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*.

**▼B**

Celulele folosite pentru testul de fototoxicitate sunt însămânțate în mediul de cultură la densitatea corespunzătoare, astfel încât culturile să nu ajungă la confluență înainte de terminarea testului, respectiv atunci când se determină viabilitatea celulară după 48 de ore de la însămânțarea celulelor. Pentru celulele Balb/c 3T3 cultivate pe plăci cu 96 de godeuri, densitatea celulară recomandată este de  $1 \times 10^4$  celule pe godeu.

Pentru fiecare substanță chimică testată, celule sunt însămânțate în mod identic pe două plăci separate, cu câte 96 de godeuri, utilizate ulterior, în mod concomitent pe toată durata procedurii de testare, în condiții de cultură identice, cu excepția intervalului de timp în care o placă este iradiată (+ Irr) și cealaltă este păstrată la întuneric (– Irr).

#### 1.4.1.4. *Pregătirea substanțelor de testare*

Substanțele de testare trebuie să fie proaspăt preparate, chiar înaintea utilizării, cu excepția cazului în care există date care dovedesc stabilitatea acestora în timpul depozitării. Se recomandă ca manipularea tuturor substanțelor chimice, precum și tratarea inițială a celulelor să se efectueze în condiții de luminozitate care să evite fotoactivarea sau degradarea substanței de testare înaintea iradierii.

Substanțele chimice testate trebuie dizolvate în soluții saline tamponate, de exemplu soluție salină echilibrată Earl (Earle's Balanced Salt Solution – EBSS) sau alte soluții tampon echilibrate fiziologic, care nu trebuie să conțină componente proteice și care absorb lumina (de exemplu indicatori de pH colorați și vitamine), în vederea evitării interferenței în timpul iradierii. Din moment ce, în timpul iradierii, celulele sunt ținute timp de aproximativ 50 de minute în afara incubatorului CO<sub>2</sub>, trebuie luate măsuri pentru a evita alcalinizarea. Aceasta se poate realiza prin incubarea celulelor la 7,5 % CO<sub>2</sub>, în cazul în care se folosesc tampoane slabe ca EBSS. Dacă celulele sunt incubate la doar 5 % CO<sub>2</sub>, se va selecta un tampon mai puternic.

Substanțele chimice de testare cu solubilitate limitată în apă trebuie dizolvate într-un solvent corespunzător. În cazul în care se utilizează un anumit solvent, acesta trebuie să fie prezent în volum constant în toate culturile, respectiv în probele negative (solvent), precum și în toate concentrațiile substanței chimice testate și să fie necitotoxic în concentrația utilizată. Concentrațiile soluțiilor de testat ar trebui selectate astfel încât să se evite precipitarea sau soluțiile în suspensie.

Solvenții recomandați sunt dimetilsulfoxidul (DMSO) și etanolul (EtOH). Pot fi adecvați și alți solvenți cu citotoxicitate redusă (de exemplu acetona). Se recomandă ca, înainte de utilizare, să se efectueze o evaluare atentă a proprietăților specifice ale tuturor solvenților, de exemplu reacția cu substanța chimică testată, atenuarea efectului fototoxic, proprietățile de fixare a radicalilor și/sau stabilitatea chimică în solvent.

Pentru facilitarea solubilizării, se pot utiliza agitatorul Vortex, dezintegrarea cu ultrasunete și/sau încălzirea la temperaturi adecvate, cu condiția ca stabilitatea substanței testate să nu fie afectată.

## ▼B

## 1.4.1.5. Condiții de iradiere

## 1.4.1.5.1. Sursa de lumină

Alegerea unei surse de lumină și a unei filtrări corespunzătoare reprezintă factorul principal pentru testarea fototoxicității. Gama UVA și de lumină vizibilă sunt asociate, de obicei, reacțiilor fototoxice *in vivo* (3) (12), în timp ce, în general, gama UVB este mai puțin importantă, dar este foarte citotoxică; citotoxicitatea crește de o mie de ori pe măsură ce lungimea de undă trece de la 313 nm la 280 nm (13). Criteriile pentru alegerea unei surse corespunzătoare de lumină trebuie să includă cerința ca sursa de lumină să emită lungimi de undă absorbite de substanța chimică testată (spectru de absorbție) și ca doza de lumină (care se poate obține într-un timp de expunere rezonabil) să fie suficientă pentru detectarea substanțelor fotocitotoxice cunoscute. În plus, lungimile de undă și dozele utilizate nu ar trebui să dăuneze în mod nejustificat sistemului, de exemplu emisia de căldură (regiunea infraroșu).

Simularea luminii solare cu simulatori solari este considerată sursa optimă de lumină artificială. Distribuția puterii de iradiere a simulatorului solar cu filtru trebuie să fie apropiată de cea a luminii exterioare naturale menționate la punctul (14). Se utilizează ca simulatoarele solare atât arcurile cu xenon, cât și arcurile (dopate) cu halogenuri din mercur/metalice. Acestea din urmă prezintă avantajul că emit mai puțină căldură și sunt mai ieftine, dar reproducerea luminii solare este inferioară în comparație cu arcurile cu xenon. Deoarece toate simulatoarele solare emit cantități importante de UVB, ar trebui să fie dotate cu filtre corespunzătoare pentru atenuarea lungimilor de undă UVB puternic citotoxice. Deoarece materialele plastice pentru culturile de celule conțin stabilizatori UV, spectrul al trebui măsurat cu ajutorul aceluiași tip de placă cu 96 de godeuri, utilizat la testare. Indiferent de măsurile luate pentru atenuarea unor părți din spectru prin filtrare sau prin efecte inevitabile de filtrare a echipamentului, spectrul înregistrat sub aceste filtre nu trebuie să devieze de la lumina naturală, exterioară, standardizată (14). Un exemplu de distribuție a iradianței spectrale a simulatorului solar cu filtru, utilizat în studiul de validare a testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, a fost publicat în (8) (16). A se vedea, de asemenea, apendicele 2 figura 1.

## 1.4.1.5.2. Dozimetrie

Intensitatea luminii (iradianța) ar trebui controlată în mod regulat înaintea fiecărui test de fototoxicitate, folosind un radiometru UV corespunzător, cu bandă largă. Intensitatea trebuie măsurată cu ajutorul aceluiași tip de placă cu 96 de godeuri, care va fi utilizat la testare. Radiometrul UV trebuie să fie calibrat în funcție de sursă. Performanța radiometrului UV ar trebui verificată, recomandându-se utilizarea unui al doilea radiometru de referință pentru măsurarea UV, de același tip, calibrat în mod identic. În mod ideal, la intervale mai mari, ar trebui utilizat un spectroradiometru pentru măsurarea iradianței spectrale a sursei de lumină filtrate și controlul calibrării radiometrului UV cu bandă largă.

S-a stabilit că o doză de  $5 \text{ J/cm}^2$  (măsurată în gama UVA) nu este citotoxică pentru celulele Balb/c 3T3, fiind suficient de puternică pentru a excita chiar și substanțele chimice pentru a obține reacții fototoxice (6) (17). De exemplu, pentru a obține  $5 \text{ J/cm}^2$  în 50 de minute, iradianța a fost reglată la  $1,7 \text{ mW/cm}^2$ . A se vedea apendicele 2, figura 2. Dacă se utilizează o altă linie de celule sau o sursă diferită de lumină, calibrarea dozei de iradianță poate fi necesară astfel încât doza respectivă să nu fie nocivă pentru celule, dar să fie suficientă pentru a excita fototoxinele standard. Timpul de expunere la lumină se calculează astfel:

**▼B**

$$t(\text{min}) = \frac{\text{doza de irandianță } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irandianță } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Ws})$$

**1.4.2. Condiții de testare****1.4.2.1. Concentrații ale substanțelor de testare:**

Gama concentrațiilor unei substanțe chimice testate în prezența (+ Irr) și în absența (–Irr) luminii ar trebui determinate corespunzător prin experimente pentru aflarea dozelor. S-ar putea dovedi folositoare evaluarea solubilității, la început și după 60 de minute (sau după intervalul de timp utilizat pentru tratare), deoarece solubilitatea se poate modifica în timp sau pe durata expunerii. Pentru a evita toxicitatea provocată de condițiile necorespunzătoare de cultură sau de substanțele chimice puternic acide ori alcaline, pH-ul culturilor de celule la care s-a adăugat substanța chimică testată ar trebui să se încadreze în limitele 6,5-7,8.

Cea mai mare concentrație a substanței testate trebuie să se încadreze în condițiile fiziologice de testare, de exemplu trebuie evitat pH-ul osmotic și de stres. În funcție de substanța chimică testată, ar putea fi necesar să se aibă în vedere și alte proprietăți fizico-chimice ca factori importanți în limitarea celei mai mari valori a concentrației de test. În ceea ce privește substanțele relativ insolubile netoxice la concentrații care merg până la punctul de saturație, ar trebui testată cea mai mare concentrație care poate fi atinsă. În general, trebuie evitată precipitarea substanței chimice de testare la oricare dintre concentrațiile de testare. Concentrația maximă a unei substanțe de test nu trebuie să depășească 1 000 µg/ml; osmolaritatea nu ar trebui să depășească 10 mmolar. Ar trebui utilizată o serie de diluții geometrice incluzând 8 concentrații ale substanței testate cu un factor constant de diluție (a se vedea punctul 2.1 al doilea paragraf).

Dacă s-a obținut informația (pe baza unui experiment de identificare a limitelor) că substanța testată nu este citotoxică până la limita de concentrație a experimentului la întuneric (– Irr), dar că este puternic citotoxică la lumină (+ Irr), limitele concentrației care trebuie selectate pentru experimentul la lumină (+ Irr) pot fi diferite de limitele selectate pentru experimentul la întuneric (– Irr), în vederea îndeplinirii cerințelor privind calitatea corespunzătoare a datelor.

**1.4.2.2. Controale****1.4.2.2.1. Sensibilitatea celulelor la radiații, stabilirea datelor anterioare**

Celulele ar trebui verificate în mod regulat (aproximativ la fiecare a cincea reînsămânțare), în ceea ce privește sensibilitatea la sursa de lumină, evaluând viabilitatea acestora în urma expunerii la doze din ce în ce mai mari de iradiere. Pentru această evaluare, trebuie folosite mai multe doze de iradiere, inclusiv niveluri semnificativ mai ridicate decât cele utilizate pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU. Metoda cea mai simplă de cuantificare a acestor doze constă în măsurarea spectrului UV din sursa de lumină. Celulele sunt înșămânțate la densitatea utilizată pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* și iradiate în ziua următoare. Ulterior, viabilitatea celulară se determină o zi mai târziu, utilizând fixarea colorantului roșu neutru. Trebuie să se demonstreze că cea mai mare doză necitotoxică rezultată (de exemplu în studiul de validare: 5 J/cm<sup>2</sup> [UVA]) este suficientă pentru a clasifica, în mod corect, substanțele chimice de referință (tabelul 1).

**▼B****1.4.2.2.2. Sensibilitatea la radiații, verificarea testului în curs**

Testul îndeplinește criteriile de calitate dacă probele negative/solvente iradiate indică o viabilitate mai mare de 80 % în comparație cu probele negative/solvente neiradiate.

**1.4.2.2.3. Viabilitatea probelor de solvent**

Densitatea optică absolută ( $DO_{540 \text{ NRU}}$ ) din colorantul roșu neutru extras din probele de solvent indică dacă cele  $1 \times 10^4$  celule însă-mânțate per godeu s-au dezvoltat cu un timp de dublare normal în cele două zile de testare. Testul îndeplinește criteriile de acceptare dacă media  $DO_{540 \text{ NRU}}$  pentru probele netratate este  $\geq 0,4$  (aproximativ de douăzeci de ori absorbanta de bază a solventului).

**1.4.2.2.4. Controlul pozitiv**

O substanță chimică fototoxică cunoscută este testată în același timp cu fiecare test de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*. Se recomandă clorpromazinul (CPZ). Pentru CPZ testat conform procedurii standard în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, s-au stabilit următoarele criterii de acceptare a testului: CPZ iradiată (+ Irr):  $IC_{50} = 0,1-2,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , CPZ neiradiată (– Irr):  $IC_{50} = 7,0-90,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Factorul de fotoiritare (PIF) ar trebui să fie  $> 6$ . Datele controlului pozitiv trebuie monitorizate.

În locul clorpromazinului se pot utiliza ca probe pozitive simultane și alte substanțe chimice fototoxice, care corespund clasei de substanțe chimice sau caracteristicilor de solubilitate ale substanței chimie evaluate.

**1.4.3. Procedura de testare (6) (7) (8) (16) (17):****1.4.3.1. Prima zi**

Se varsă 100  $\mu\text{l}$  mediu de cultură în godeurile periferice ale unei plăci de microtitru de cultură tisulară cu 96 de godeuri (= goale). În celelalte godeuri se varsă 100  $\mu\text{l}$  dintr-o suspensie celulară de  $1 \times 10^5$  celule/ml în mediul de cultură (=  $1 \times 10^4$  celule/godeu). Se pregătesc două plăci pentru fiecare serie de concentrații ale substanței de testare, precum și pentru probele pozitive și de solvent.

Se incubează celulele timp de 24 de ore (a se vedea punctul 1.4.1.2) până când formează un monostrat semiconfluent. Această perioadă de incubare permite recuperarea, aderența și creșterea exponențială a celulei.

**1.4.3.2. A doua zi**

După incubare, se decantează mediul de cultură din celule și se spală cu atenție cu 150  $\mu\text{l}$  din soluția tampon folosită pentru incubare. Se adaugă 100  $\mu\text{l}$  de soluție tampon cu o concentrație adecvată a substanței chimice de testare sau a solventului (solvent de control). Se aplică 8 concentrații diferite din substanța chimică de testare. Se incubează celulele cu substanța de testare la întuneric timp de 60 de minute (a se vedea punctul 1.4.1.2 și punctul 1.4.1.4 paragraful al doilea).

Dintre cele două plăci pregătite pentru fiecare serie de concentrații ale substanței de testare și ale probelor de control, se selectează una, în general în mod aleatoriu, pentru a se determina citotoxicitatea (– Irr) (de exemplu, placa de control), iar cealaltă (placa de tratare) pentru determinarea fotocitotoxicității (+ Irr).



**▼B**

Pentru realizarea expunerii la + Irr, se iradiază celulele la temperatura camerei timp de 50 de minute, prin capacul plăcii, cu cea mai mare doză de radiație necitotoxică (a se vedea, de asemenea, appendicele 2). Plăcile neiradiate (– Irr) se păstrează la temperatura camerei, într-o cutie închisă, timp de 50 de minute (= timpul de expunere la lumină).

Se decantează soluția de testare și se spală cu atenție, de două ori, cu 150 µl din soluția tampon folosită pentru incubație, dar care nu conține substanța de testare. Se înlocuiește soluția tampon cu mediul de cultură și se incubează (a se vedea punctul 1.4.1.2) peste noapte (18-22 ore).

1.4.3.3. *A treia zi*

## 1.4.3.3.1. Evaluarea microscopică

Pentru examinarea celulelor din punct de vedere al dezvoltării, morfologiei și integrității monostratului trebuie utilizat un microscop cu contrast de fază. Se înregistrează modificările apărute în morfologia celulei și efectele asupra dezvoltării celulei.

## 1.4.3.3.2. Testul de fixare a colorantului roșului neutru

Se spală celulele cu 150 µl de soluție tampon încălzită în prealabil. Soluția de spălare se îndepărtează prin tamponare ușoară. Se adaugă 100 µl de soluție de roșu neutru 50 µg/ml (RN) (clorhidrat de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin, număr EINECS 209-035-8; număr CAS 553-24-2; C.I. 50040) în mediu fără ser (16) și se incubează conform descrierii de la punctul 1.4.1.2, timp de 3 ore. După incubație, se îndepărtează mediul de RN și se spală celulele cu 150 µl de soluție tampon. Se decantează, iar surplusul de soluție tampon se îndepărtează cu un material absorbant sau prin centrifugare.

Se adaugă exact 150 µl de soluție RN de desorbție (preparată proaspăt din 49 părți apă + 50 părți etanol + 1 parte acid acetic).

Se agită ușor placa de microtitru pe un aparat de agitare pentru plăcile de microtitru timp de 10 minute, până când roșul neutru este extras din celule și formează o soluție omogenă.

Se măsoară densitatea optică a extrasului de roșu neutru la 540 nm într-un spectrofotometru, utilizându-se godeurile goale ca puncte de referință. Pentru analize ulterioare, datele se salvează într-un fișier electronic corespunzător.

2. **DATE**

## 2.1. CALITATEA ȘI CANTITATEA DATELOR

Datele testului trebuie să permită o analiză semnificativă relațiilor concentrație-răspuns obținute în prezența și în absența iradierii și, dacă este posibil, o identificare a concentrației substanței chimice de testare la care viabilitatea celulară este redusă la 50 % (IC<sub>50</sub>). Dacă se constată o citotoxicitate, atât gama de concentrații cât și intervalul între fiecare concentrație trebuie stabilite astfel încât să permită adaptarea unei curbe la datele experimentale.

Atât pentru rezultatele clar pozitive, cât și pentru cele clar negative (a se vedea punctul 2.3, primul paragraf), experimentul principal poate fi suficient, însoțit de unul sau mai multe experimente preliminare de identificare a gamei de doze.

## ▼B

Rezultatele echivoce, la limită sau neclare trebuie clarificate prin testări suplimentare (a se vedea, de asemenea, punctul 2.4 al doilea paragraf). În astfel de cazuri, trebuie luată în considerare modificarea condițiilor de testare. Condițiile de testare care ar putea fi modificate includ: gama de concentrații sau distanța dintre ele, timpul de preincubare, precum și timpul de expunere la iradiere. Pentru substanțele chimice instabile în apă, poate fi mai adecvat un timp de expunere mai scurt.

## 2.2. EVALUAREA REZULTATELOR

Pentru a facilita evaluarea datelor, se poate calcula factorul de fotoiritare (PIF) sau fotoefectul mediu (MPE).

Pentru calcularea măsurilor de fotocitotoxicitate (a se vedea mai jos), setul valorilor concentrație-răspuns distincte trebuie aproximat printr-o curbă concentrație-răspuns continuă corespunzătoare (model). Adaptarea curbei la date se realizează în mod obișnuit printr-o metodă de regresie nelineară (18). Pentru a estima influența variabilității datelor asupra curbei adaptate, se recomandă o procedură de „bootstrap”.

Factorul de fotoiritare (PIF) se calculează folosind următoarea formulă:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

Dacă  $\text{IC}_{50}$  în prezența sau în absența luminii nu se poate calcula, nici PIF pentru substanța de testare nu poate fi determinat. Fotoefectul mediu (MPE) se bazează pe comparația curbelor concentrație-răspuns complete (19). Acesta este definit ca media ponderală a unui set reprezentativ de valori ale fotoefectului.

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Fotoefectul  $\text{PE}_C$ , la o concentrație oarecare  $C$  este definit ca produsul dintre efectul de răspuns  $\text{RE}_C$  și efectul de doză  $\text{DE}_C$ , respectiv  $\text{PE}_C = \text{RE}_C \times \text{DE}_C$ . Efectul de răspuns  $\text{RE}_C$  reprezintă diferența dintre răspunsurile obținute în absența și în prezența luminii, respectiv  $\text{RE}_C = R_C(-\text{Irr}) - R_C(+\text{Irr})$ . Efectul de doză este dat de formula:

$$\text{DE}_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

unde  $C^*$  reprezintă concentrația de echivalență, respectiv concentrația la care răspunsul  $+ \text{Irr}$  este egal cu răspunsul la  $- \text{Irr}$  la concentrația  $C$ . Dacă  $C^*$  nu poate fi determinat din cauză că valorile de răspuns ale curbei  $+ \text{Irr}$  sunt, în mod constant, mai mari sau mai mici decât de  $R_C(-\text{Irr})$ , efectul de doză este stabilit la valoarea 1. Factorii de ponderare  $w_i$  rezultă din valoarea de răspuns cea mai mare, respectiv,  $w_i = \text{MAX} \{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$ . Grila de concentrații  $C_i$  este selectată astfel încât același număr de puncte să figureze în fiecare dintre intervalele de concentrații definite de valorile de concentrații utilizate în experiment. Calculul MPE se limitează la valoarea maximă a concentrației pentru care cel puțin una dintre cele două curbe indică o valoare de răspuns de minim 10 %. Dacă această concentrație maximă este mai mare decât cea mai mare concentrație utilizată în experimentul  $+ \text{Irr}$ , partea rămasă din curba  $+ \text{Irr}$  se fixează la valoarea de răspuns „0”. Substanța chimică este clasificată drept fototoxică în funcție de valoarea MPE, mai mare sau nu decât o valoare limită selectată corespunzător ( $\text{MPE}_c = 0,15$ ).

**▼B**

Pentru calcularea PIF și MPE, referința (20) pune la dispoziție un pachet de programe.

### 2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Pe baza studiului de validare (8), substanța de testare cu un PIF < 2 sau un MPE < 0,1 indică: „absența fototoxicității”. Un PIF > 2 și < 5 sau un MPE > 0,1 și < 0,15 indică: „fototoxicitate probabilă”, iar un PIF > 5 sau un MPE > 0,15 indică: „fototoxicitate”.

În cazul laboratoarelor care efectuează acest test pentru prima dată, substanțele de referință menționate în tabelul 1 trebuie testate înainte de evaluarea fototoxicității substanțelor de testare. Valorile PIF sau MPE trebuie să fie apropiate de valorile menționate în tabelul 1.

**Tabelul 1**

| Denumirea chimică          | Nr. EINECS | Nr. CAS      | PIF      | MPE       | Punctul maxim de absorbție | Solvent <sup>(1)</sup> |
|----------------------------|------------|--------------|----------|-----------|----------------------------|------------------------|
| Amiodaronă HCL             | 243-293-2  | [19774-82-4] | > 3,25   | 0,27-0,54 | 242 nm<br>300 nm<br>(prag) | etanol                 |
| Clorpromazin HCL           | 200-701-3  | [69-09-0]    | > 14,4   | 0,33-0,63 | 309 nm                     | etanol                 |
| Norfloxacin                | 274-614-4  | [70458-96-7] | > 71,6   | 0,34-0,90 | 316 nm                     | acetonitril            |
| Antracen                   | 204-371-1  | [120-12-7]   | > 18,5   | 0,19-0,81 | 356 nm                     | acetonitril            |
| Protoporfirină IX de sodiu | 256-815-9  | [50865-01-5] | > 45,3   | 0,54-0,74 | 402 nm                     | etanol                 |
| L-Histidină                |            | [7006-35-1]  | fără PIF | 0,05-0,10 | 211 nm                     | apă                    |
| Hexaclorofen               | 200-733-8  | [70-30-4]    | 1,1-1,7  | 0,00-0,05 | 299 nm<br>317 nm<br>(prag) | etanol                 |
| Lauril sulfat de sodiu     | 205-788-1  | [151-21-3]   | 1,0-1,9  | 0,00-0,05 | fără absorbție             | apă                    |

<sup>(1)</sup> Solventul utilizat pentru măsurarea absorbției.

### 2.4. INTERPRETAREA DATELOR

Dacă efectele fototoxice sunt observate doar la cea mai mare concentrație de testare, (în special pentru substanțele chimice solubile în apă), poate fi necesar să se ia în considerare alte elemente pentru evaluarea riscurilor, precum date privind absorbția cutanată, acumularea substanțelor chimice în piele și/sau date obținute de la alte teste, cum ar fi testarea substanței chimice *in vitro*, pe piele umană sau animală sau pe alte modele de piele.

**▼B**

Dacă nu se demonstrează existența toxicității (+ Irr și – Irr) și dacă solubilitatea scăzută a limitat concentrațiile care puteau fi testate, atunci se poate pune sub semnul întrebării compatibilitatea substanței de testare cu testul, fiind util să se ia în considerare efectuarea unui test de confirmare utilizând, de exemplu, un alt model.

3. **RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța testată:

- datele de identificare, denumirile generice comune și numerele IUPAC și CAS, dacă se cunosc;
- starea fizică și puritatea;
- proprietățile fizico-chimice relevante pentru efectuarea studiului;
- spectrul de absorbție UV/vizibilă;
- stabilitatea și fotostabilitatea, dacă se cunosc.

Solventul:

- justificarea alegerii solventului;
- solubilitatea substanței chimice testate în solvent;
- procentul de solvent prezent în mediul de tratare.

Celulele:

- tipul și sursa celulelor;
- absența micoplasmei;
- numărul de reînsămânțare al celulelor, dacă se cunoaște;
- sensibilitatea celulelor la radiații, stabilită cu aparatul de iradiere utilizat în cadrul testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*.

Condițiile de testare (1); *incubația înainte și după tratare*:

- tipul și compoziția mediului de cultură;
- condițiile de incubare (concentrația de CO<sub>2</sub>; temperatura; umiditatea);
- durata incubației (înainte și după tratare).

Condițiile de testare (2); *tratare cu substanța chimică*:

- motivele selectării concentrațiilor substanței chimice de testare utilizate în prezența și în absența iradierii;
- în cazul unei solubilități limitate a substanței de testare și a absenței citotoxicității: motivul testării celei mai ridicate concentrații;
- tipul și compoziția mediului de tratare (soluție salină tampon);
- durata tratării chimice.

Condiții de testare (3); *iradierea*:

- motivul pentru alegerea sursei de lumină utilizate;

**▼B**

- producătorul și tipul sursei de lumină și a radiometrului;
- caracteristicile de iradiere spectrală ale sursei de lumină;
- caracteristicile de transmisie și absorbție ale filtrului (filtrelor) utilizat(e);
- caracteristicile radiometrului și detaliile privind calibrarea acestuia;
- distanța dintre sursa de lumină și sistemul de testare;
- iradierea UVA la această distanță, exprimată în  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ;
- durata expunerii la lumină UV/vizibilă;
- doza de UVA (iradiere  $\times$  timp), exprimată în  $\text{J}/\text{cm}^2$ ;
- temperatura culturilor de celule în timpul iradierii și a culturilor de celule ținute concomitent la întuneric.

Condiții de testare (4); *testul de viabilitate cu roșu neutru*:

- compoziția mediului de tratare cu roșu neutru;
- durata de incubație a roșului neutru;
- condițiile de incubație (concentrația de  $\text{CO}_2$ , temperatura, umiditatea);
- condițiile de extragere a roșului neutru (soluția de extragere, durata);
- lungimea de undă utilizată pentru citirea spectrofotometrică a densității optice a roșului neutru;
- a doua lungime de undă (referință), dacă este utilizată;
- conținutul spațiului liber al spectrofotometrului, dacă este utilizat.

Rezultate:

- viabilitatea celulară obținută la fiecare concentrație a substanței chimice de testare, exprimată în viabilitatea procentuală medie a probelor de solvent simultane;
- curbele concentrație-răspuns (concentrația substanței chimice de testare comparată cu viabilitatea celulară relativă) obținute în experimente simultane + Irr și – Irr;
- analiza curbelor concentrație-răspuns: dacă este posibil, estimarea/calcularea  $\text{IC}_{50}$  (+ Irr) și  $\text{IC}_{50}$  (– Irr);
- compararea celor două curbe concentrație-răspuns obținute în prezența și în absența iradierii, fie prin calcularea factorului de fotoiritare (PIF), fie prin calcularea fotoefectului mediu (MPE);
- criteriile de acceptare a testului, solvent de control simultan:
- viabilitatea absolută (densitatea optică a extrasului de roșu neutru) a celulelor iradiate și neiradiate;
- datele istorice privind controalele negativ și de solvent simultane, deviații medii și standard.
- criteriile de acceptare ale testului, control pozitiv simultan:

## ▼B

— IC<sub>50</sub>(+ Irr) și IC<sub>50</sub>(– Irr) și PIF/MPE ale substanței chimice de control pozitiv;

— datele chimice istorice ale controlului pozitiv: IC<sub>50</sub>(+ Irr) și IC<sub>50</sub>(– Irr) și PIF/MPE, deviații medii și standard.

Discutarea rezultatelor

Concluzii.

## 4.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

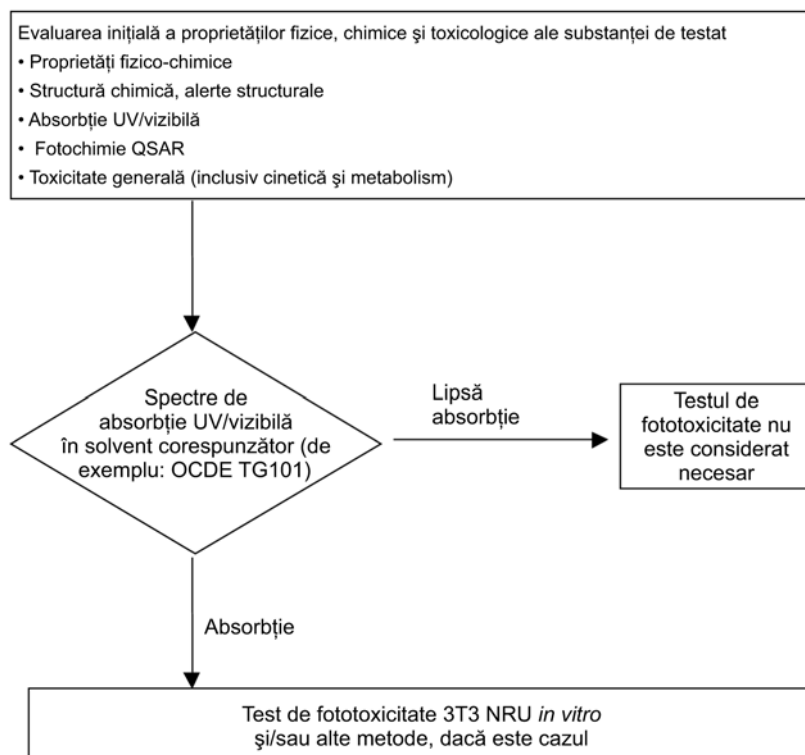
1. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95-102.
2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
3. Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapor, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA*, 22, 314-348.
4. Spikes, J. D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology” Edited by K. C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, pp. 79-110.
5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water” Environment Directorate, OECD, Paris.
6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L’Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, 793-796.
7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA*, 26, 7-8.
8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305-327.
9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30<sup>th</sup>-31<sup>th</sup> October 2001, Secretariat’s Final Summary Report, 15<sup>th</sup> March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
10. Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
11. Hay, R. J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.

## ▼B

12. Lambert L. A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology”, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, pp. 515-530.
13. Tyrrell R. M., Pidoux M. (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.
15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
18. Holzhütter, H. G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
19. Holzhütter, H. G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445-462.
20. [http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)

**▼ B**

## APENDICELE 1

**Rolul testului de fototoxicitate 3T3 NRU într-o abordare secvențială a testării fototoxicității substanțelor chimice**

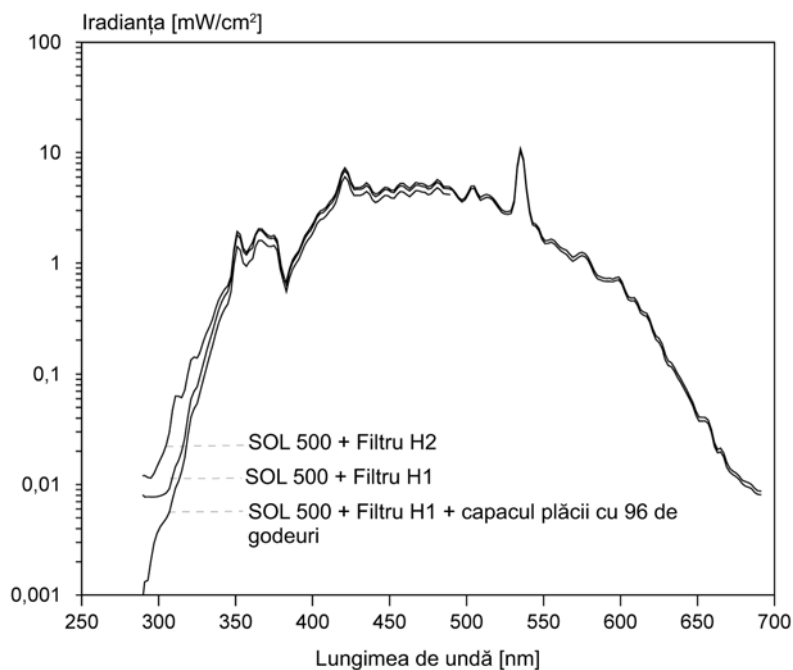


▼ B

## APENDICELE 2

Figura 1

Distribuția spectrală a iradierii unui simulator solar cu filtru



(a se vedea punctul 1.4.1.5 al doilea paragraf)

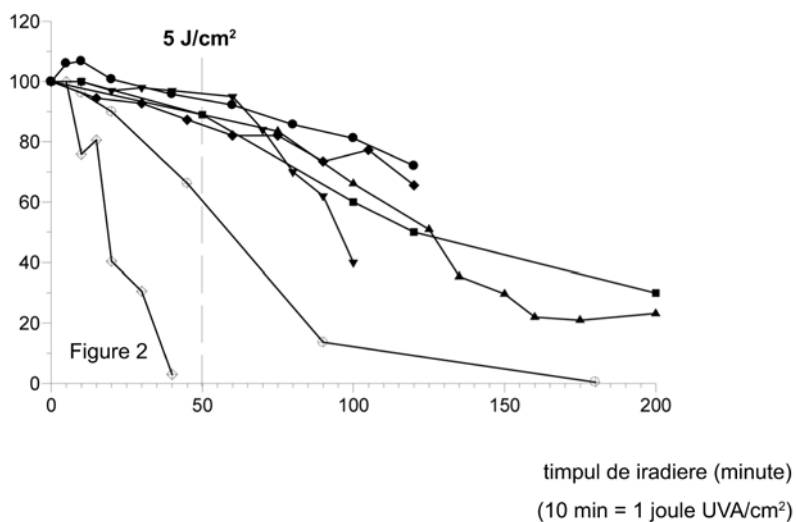
Figura 1 oferă un exemplu al unei distribuții acceptabile de iradiere spectrală pentru un simulator solar cu filtru. Aceasta corespunde sursei de halogenură metalică dopată utilizată în studiul de validare a testului 3T3 NRU (6) (8) (17). Se prezintă efectul a două filtre diferite și efectul de filtrare suplimentară a capacului plăcii de cultură cu 96 de godeuri. Filtrul H2 a fost utilizat doar cu sistemele de testare care pot tolera o cantitate mai mare de UVB (testul pe modelul de piele și testul de fotohemoliză a globulelor roșii). În cadrul testului 3T3 NRU s-a utilizat filtrul H1. Figura arată că efectul de filtrare suplimentară a capacului plăcii se observă în principal în gama UVB, lăsând suficiente raze UVB în spectrul de iradiere pentru a stimula substanțele chimice care absorb în mod obișnuit gama UVB, precum amiodarona (a se vedea tabelul 1).

▼ B

Figura 2

**Sensibilitatea celulelor Balb/c 3T3 la iradiere (conform măsurărilor în gama UVA)**

Viabilitatea celulară ( % de fixare a roșului neutru a probelor de control la întuneric)



(a se vedea punctele 1.4.1.5.2 al doilea paragraf; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilitatea celulelor Balb/c 3T3 la iradierea cu simulatorul solar utilizat în studiul de validare a testului de fototoxicitate 3T3 NRU, conform măsurărilor efectuate în gama UVA. Figura prezintă rezultatele obținute în 7 laboratoare diferite în cadrul studiului de prevalidare (1). Cele două curbe cu simboluri deschise la culoare au fost obținute cu celule îmbătrânite (număr mai mare de reînsămânțări) care au trebuit înlocuite cu serii de celule noi, iar curbele cu simboluri îngroșate indică celule cu o toleranță acceptabilă la iradiere.

Pe baza acestor date a fost derivată doza cea mai mare de iradiere necitotoxică de 5 J/cm<sup>2</sup> (linia verticală punctată). Linia orizontală punctată arată, în plus, efectul de iradiere maxim acceptabil menționat la punctul 1.4.2.2.

▼ **M3****B.42. SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONII LIMFATICI****INTRODUCERE**

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, a evoluției necesităților de reglementare și a considerațiilor referitoare la bunăstarea animalelor. Metoda de testare (MT) inițială pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglionii limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429; capitolul B.42 din prezenta anexă), a fost adoptată anterior (1). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). LLNA actualizată se bazează pe evaluarea experienței și a datelor științifice (12). Aceasta este a doua metodă de testare desemnată de evaluare a potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Cealaltă metodă de testare (și anume orientarea OCDE privind testarea nr. 406; capitolul B.6 din prezenta anexă) utilizează teste pe cobai, în special testul de maximizare la cobai și testul Buehler (13). LLNA oferă avantaje comparativ cu B.6 și cu orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13) în ceea ce privește bunăstarea animalelor. Prezenta MT actualizată LLNA include un set de standarde de performanță (SP) (apendicele 1) care pot fi folosite pentru a evalua stadiul de validare a metodelor de testare noi și/sau modificate care sunt similare cu LLNA din punct de vedere funcțional și mecanic, în conformitate cu principiile documentului de orientare nr. 34 al OCDE (14).
2. Testul studiază etapa de inducere a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-efect. Trebuie avut în vedere faptul că agenții de sensibilizare slabi/moderați, recomandați ca substanțe martor pozitiv adecvate pentru metodele de testare pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), sunt adecvați și pentru utilizarea în cadrul LLNA (6) (8) (15). Prezenta metodă de testare descrie, de asemenea, o metodă simplificată a LLNA (rLLNA) opțională, care ar putea utiliza cu până la 40 % mai puține animale (16) (17) (18). rLLNA poate fi utilizată atunci când există o necesitate de reglementare pentru a confirma o estimare negativă a potențialului de sensibilizare dermică, cu condiția să se respecte toate celelalte specificații de protocol LLNA, astfel cum sunt descrise în prezenta MT. Estimarea unui rezultat negativ se bazează pe toate informațiile disponibile descrise la punctul 4. Înainte de a aplica metoda rLLNA, trebuie furnizate justificări științifice clare pentru utilizarea acesteia. În cazul în care, contrar estimărilor, se obține un rezultat pozitiv sau echivoc în cadrul rLLNA, ar putea fi necesare testări suplimentare pentru a interpreta sau clarifica rezultatul. rLLNA nu trebuie utilizată pentru identificarea substanțelor de testare periculoase în ceea ce privește sensibilizarea dermică în cazul în care sunt necesare informații referitoare la relația doză-efect precum, de exemplu, pentru sub-categoriile din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor și din Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite.

**DEFINIȚII**

3. Definițiile utilizate sunt prevăzute în apendicele 2.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE**

4. LLNA reprezintă o metodă alternativă de identificare a potențialelor substanțe chimice care produc o sensibilizare dermică. Aceasta nu implică în mod necesar că LLNA trebuie utilizată sistematic în locul testelor pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), ci mai curând că acest test este de aceeași calitate și că poate fi utilizat ca o alternativă pentru care rezultatele pozitive și negative nu mai necesită, în general, confirmări

## ▼ M3

suplimentare. Laboratorul de testare ar trebui să țină seama de toate informațiile disponibile referitoare la substanța de test anterior derulării studiului. Astfel de informații includ identitatea și structura chimică a substanței de test, proprietățile fizico-chimice ale acesteia, rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice referitoare la substanțele chimice asociate acesteia din punct de vedere structural. Aceste informații ar trebui avute în vedere pentru a determina dacă LLNA este sau nu potrivită pentru substanța respectivă (având în vedere incompatibilitatea unor tipuri limitate de substanțe chimice cu LLNA – a se vedea punctul 5) și pentru a contribui la selectarea dozei.

5. LLNA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea activității de sensibilizare alergică prin contact. Cu toate acestea, metoda oferă posibilitatea de a reduce numărul de animale necesare în acest scop. În plus, LLNA oferă o îmbunătățire substanțială (mai puțină durere și suferință) a modului în care sunt utilizate animalele pentru testele de sensibilizare alergică prin contact. LLNA se bazează pe evaluarea evenimentelor imunologice stimulate de substanțele chimice pe parcursul etapei de inducere a sensibilizării. Spre deosebire de testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), LLNA nu impune inducerea unor reacții de hipersensibilitate dermică printr-o manifestare a declanșării. În plus, spre deosebire de testul de maximizare la cobai (13), pentru LLNA nu este necesară utilizarea unui adjuvant. Astfel, LLNA reduce durerea și suferința animalelor. În ciuda avantajelor oferite de LLNA în comparație cu B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, trebuie recunoscut faptul că există anumite limite care pot impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 (13) [de exemplu, rezultatele fals negative la LLNA pentru anumite metale, rezultatele fals pozitive pentru anumiți agenți iritanți dermici (cum ar fi anumite substanțe chimice de tipul agenților tensioactivi) (19) (20) sau solubilitatea substanței de test]. În plus, clasele sau substanțele chimice care conțin grupe funcționale demonstrate ca acționând ca potențiali factori de confuzie (21) pot impune utilizarea testelor pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13). Mai mult, analizând baza de date de validare, limitată și formată în principal din preparate pesticide, se observă că LLNA oferă mai multe rezultate pozitive pentru aceste tipuri de substanțe de test decât testele pe cobai (22). Cu toate acestea, în momentul testării preparatelor, se poate lua în calcul includerea de substanțe similare cu rezultate cunoscute ca substanțe reper pentru a demonstra că LLNA funcționează în mod corespunzător (a se vedea punctul 16). Între aceste limite identificate, LLNA poate fi aplicată pentru testarea oricăror substanțe care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea LLNA.

## PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA este acela că agenții de sensibilizare induc proliferarea limfocitelor din ganglionii limfatici care drenează zona în care a fost aplicată substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului aplicat și constituie o metodă simplă de obținere a unei măsurători cantitative a sensibilizării. Proliferarea este măsurată comparându-se proliferarea medie la fiecare grup de test cu proliferarea medie de la grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se determină raportul dintre proliferarea medie produsă la fiecare grup tratat și cea produsă la grupul martor tratat cu vehicul, numit indice de stimulare (IS), care trebuie să aibă cel puțin valoarea 3 pentru ca substanța de test să fie clasificată ca potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise în prezenta anexă se bazează pe utilizarea marcării radioactive *in vivo* pentru măsurarea unui număr crescut de celule proliferante în ganglionii limfatici auriculari de drenare. Cu toate acestea, pot fi utilizate și alte metode de evaluare a numărului de celule proliferante, cu condiția ca cerințele referitoare SP să fie respectate integral (apendicele 1).

**▼ M3****DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Selectarea speciilor de animale**

7. Specia preferată pentru acest test este șoarecele. Se folosesc femele adulte tinere din rasa CBA/Ca sau CBA/J, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre ele trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza, de asemenea, alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA specifice rasei și/sau sexului.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (23), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

**Pregătirea animalelor**

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei, astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

**Pregătirea dozelor**

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora în urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării în urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

**Verificarea fiabilității**

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând într-un mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. Anumite autorități solicită, de asemenea, existența unei PC pentru fiecare studiu; prin urmare, utilizatorii sunt încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA. În consecință, utilizarea de rutină a unui PC concomitent este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt care este uneori impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea punctul 12). PC trebuie să prezinte un răspuns pozitiv la LLNA la un nivel

## ▼M3

de expunere estimat să determine o creștere a indicelui de stimulare (IS) > 3 față de grupul martor negativ (NC). Doza administrată în cazul PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (un IS > 20 ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v) și mercaptobenzotiazolul 5 % (nr. CAS 149-30-4) în N,N-dimetilformamida (a se vedea appendicele 1 tabelul 1). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, este posibil să fie utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.

12. În timp ce este recomandată includerea unei PC concomitente, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale  $\leq 6$  luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA în mod regulat (efectuează LLNA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecvente în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).
13. Un grup PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.
14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile acestor rezultate trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (12).
15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară, de asemenea, testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (24). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclus un VC separat pentru PC concomitent.
16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:
  - similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;
  - caracteristici fizico-chimice cunoscute;
  - date justificative provenind de la LLNA;
  - date justificative provenind de la alte modele animale și/sau om.

## ▼ M3

## PROCEDURA DE TESTARE

## Număr de animale și doză

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.
18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor din cadrul referințelor (3) și (5). Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test de interes (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (3) (25). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă pre-screening de testare (a se vedea punctele 21-24).
19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii celei mai mari concentrații posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona: ulei de măsline (4:1, v/v), N,N- dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (19), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.
20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-animale și o comparație statistică a diferențelor dintre substanța de test și măsurătorile pe grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea punctul 35). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul martor pozitiv este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (12). Mai mult, anumite autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Cu toate acestea, datele centralizate privind animalele pot fi considerate acceptabile de anumite autorități de reglementare, iar în astfel de situații utilizatorii pot opta între a colecta date individuale sau centralizate referitoare la animale.

## Testarea preliminară

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.

## ▼ M3

22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă una sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 6). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor și se punctează folosind tabelul 1 (25). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze), ziua 6. În plus, în ziua 6, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de  $\geq 3$  și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (26) (27). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA este doza imediat inferioară din seria de concentrații pre-screening (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

## Punctaje acordate eritemelor

| Observație   | Punctaj |
|--|---------|
| Fără eritem  | 0       |
| Eritem foarte ușor (abia perceptibil)  | 1       |
| Eritem bine definit  | 2       |
| Eritem moderat spre grav   | 3       |
| Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului | 4       |

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (26) (27), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu cei martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cu toate acestea, în timp ce pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (30) (32) (33) (34).
24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (35) (36) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și oricare semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutateii corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 6, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (37).



▼ **M3****Schema de tratament a studiului principal**

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

- *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică 25  $\mu$ L de substanță de test diluată în mod adecvat, numai sistemul vehicul sau martorul pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.
- *Zilele 2 și 3:* Se repetă procedura de aplicare efectuată în ziua 1.
- *Zilele 4 și 5:* Nu se aplică tratament.
- *Ziua 6:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal. Li se injectează 250  $\mu$ L de ser fiziologic tamponat cu fosfat (PBS) conținând 20  $\mu$ Ci ( $7,4 \times 10^5$  Bq) de  $^3\text{H}$ -metil timidină tuturor șoarecilor de test și celor din grupul martor prin vena codală. Alternativ, tuturor șoarecilor li se injectează 250  $\mu$ L de PBS steril conținând 2  $\mu$ Ci ( $7,4 \times 10^4$  Bq) de  $^{125}\text{I}$ -iododeoxiuridină și  $10^{-5}\text{M}$  fluorodeoxiuridină prin vena codală. După cinci ore, animalele sunt eutanasiate. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în PBS pentru fiecare animal (metodă individuală la nivel de animal); alternativ, se excizează ganglionii limfatici de la fiecare ureche și se păstrează împreună în PBS pentru fiecare grup experimental (metodă colectivă la nivel de grup tratat). Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi consultate în referință (12). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutateii eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).

**Prepararea suspensiilor celulare**

26. Se prepară o singură suspensie celulară conținând celule din ganglionii limfatici (LNC) excizate bilateral prin metoda individuală la nivel de animal sau alternativ prin metoda colectivă la nivel de grup tratat, printr-o separare mecanică ușoară realizată cu ajutorul unei site din oțel inoxidabil cu ochiuri de 200  $\mu\text{m}$  sau o altă tehnică acceptabilă de generare a unei singure suspensii celulare. LNC se spală de două ori cu PBS în exces, iar ADN-ul se precipită cu o soluție de acid tricloracetic (TCA) de 5 % la 4 °C timp de 18h (3). Granulele se suspendă din nou în 1 mL de soluție de acid tricloracetic și se transferă în flacoane de scintilație conținând 10 mL de fluid de scintilație pentru determinarea tritiului  $^3\text{H}$  sau se transferă direct în tuburile cu raze gama pentru determinarea iodului  $^{125}\text{I}$ .

**Determinarea proliferării celulare (radioactivitate încorporată)**

27. Încorporarea de  $^3\text{H}$ -metil timidină se măsoară prin determinarea  $\beta$ -scintilației, în dezintegrări pe minut (DPM). Încorporarea de  $^{125}\text{I}$ -iododeoxiuridină se măsoară prin determinarea iodului  $^{125}\text{I}$  și se exprimă, de asemenea, în DPM. În funcție de metoda utilizată, încorporarea se exprimă ca DPM/șoarece (metoda individuală la nivel de animal) sau DPM/grup tratat (metoda colectivă la nivel de grup).

**LLNA simplificată**

28. În anumite situații, atunci când există o necesitate de reglementare pentru a confirma o estimare negativă referitoare la potențialul de sensibilizare dermică, poate fi utilizat un protocol opțional rLLNA (16) (17) (18) cu mai puține animale, cu condiția să se respecte toate celelalte specificații de protocol LLNA din această metodă de testare. Înainte de aplicarea metodei rLLNA, trebuie furnizate justificări clare și științifice pentru utilizarea acesteia. În cazul în care se obțin rezultate pozitive sau echivoce, ar putea fi necesare teste adiționale pentru a interpreta sau clarifica rezultatele.

## ▼ M3

29. Reducerea numerică a grupurilor testate reprezintă singura diferență dintre protocoalele metodelor de testare LLNA și rLLNA, iar din acest motiv rLLNA nu furnizează informații referitoare la relația doză-răspuns. Prin urmare, rLLNA nu trebuie utilizată dacă sunt necesare informații referitoare la relația doză-răspuns. Ca și în cazul dozelor multiple LLNA, concentrația substanței de test evaluată în cadrul rLLNA trebuie să fie concentrația maximă care nu induce toxicitate sistemică evidentă și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece (a se vedea punctul 18).

## OBSERVAȚII

## Observații clinice

30. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricăror semne clinice, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau corозиunea pielii, în vederea eutanasierii (37).

## Greutatea corporală

31. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

## CALCULAREA REZULTATELOR

32. Rezultatele pentru fiecare grup testat se exprimă printr-un indice de stimulare (IS). Dacă se folosește metoda individuală la nivel de animal, IS se determină prin împărțirea valorii medii a DPM/șoarece din fiecare grup tratat cu substanța de test și a valorii medii pentru grupul martor pozitiv la valoarea medie a DPM/șoarece din grupul martor tratat cu solvent/vehicul. IS mediu pentru grupul martor tratat cu vehicul are valoarea 1. Dacă se folosește metoda colectivă la nivel de grup, IS se obține prin împărțirea încorporării radioactive colective înregistrate de fiecare grup tratat la încorporarea înregistrată de grupul martor tratat cu vehicul; astfel se calculează un IS mediu.
33. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când  $IS \geq 3$ . Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită ca fiind pozitiv (4)(5)(6).
34. Dacă rezultatele obținute nu sunt suficient de concludente, trebuie examinate diferențele proprietăți ale substanței de test, inclusiv dacă prezintă o relație structurală cu agenți cunoscuți de sensibilizare dermică și dacă provoacă iritații cutanate excesive la șoareci, precum și relația doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt discutate în detaliu în alt document (7).
35. Colectarea datelor de radioactivitate pentru fiecare animal permite analiza statistică a prezenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparații ale grupurilor testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparații pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul varianțelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite câteodată „valori aberante”).

**▼ M3****DATE ȘI RAPORTARE****Date**

36. Datele se sistematizează în tabele. În cazul în care se utilizează metoda individuală la nivel de animal, se precizează valorile DPM pentru fiecare animal, media DPM/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard a mediei) și IS mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul. Dacă se utilizează metoda colectivă la nivel de grup, se indică media/mediana DPM și IS mediu pentru fiecare grup tratat comparativ cu grupul VC concomitent.

**Raportul de testare**

37. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța de test și substanța martor:

- date de identificare (de exemplu, numerele CAS și CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);
- starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);
- în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

- date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);
- justificarea alegerii vehiculului;

Animalele de experiență:

- proveniența șoarecilor de rasa CBA;
- statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

- detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;
- justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);
- concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);
- detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;
- detalii privind abaterile de protocol și explicații referitoare la modul în care acestea afectează abaterea de la conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

- un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;
- date concomitente și/sau istorice privind martorii pozitivi și negativi, utilizate de laboratorul de testare;

▼ **M3**

- în cazul în care nu a fost inclus un martor pozitiv (PC) concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent martor pozitiv periodic și un raport detaliind datele istorice privind martorii pozitivi specifice laboratorului astfel încât să se justifice de ce nu a fost pus în aplicare niciun martor pozitiv concomitent;

## Rezultate:

- greutatea fiecărui șoarece la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și intervalul de eroare asociat (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;
- momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;
- tabloul valorilor individuale (metoda individuală) sau medii/mediane (metoda colectivă la nivel de grup tratat) exprimate ca DPM (dezin-tegrare pe minut), precum și valorile IS pentru fiecare grup tratat;
- media și marja de eroare asociată (de exemplu deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a DPM/animal pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante pentru fiecare grup tratat, dacă se utilizează metoda individuală la nivel de animal;
- indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în cadrul grupurilor tratate cu substanța de test, cât și în cadrul grupurilor martor, dacă se utilizează metoda individuală la nivel de animal;
- relația doză-răspuns;
- analize statistice, dacă este cazul;

## Discutarea rezultatelor:

- un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, precum și o concluzie care să indice dacă substanța de testat trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

## ▼ M3

- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llnaps/LLNAPerfStd.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStd.pdf)]
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Disponibil la: [[http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC26\\_statement\\_rLLNA\\_20070525-1.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf)]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/lnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/lnarep.pdf)]

## ▼ M3

- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Disponibil la: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

**▼ M3**

- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)]
  
- (37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ **M3***Apendicele 1***Standarde de performanță pentru evaluarea metodelor de testare LLNA similare sau modificate propuse pentru sensibilizarea dermică****INTRODUCERE**

1. Scopul standardelor de performanță (SP) este de a indica temeiul de evaluare a acurateții și fiabilității noilor metode de testare, protejate sau nu (de exemplu, cu drept de autor, marcă depusă sau înregistrare), în raport cu obiectivele definite. Standardele de performanță, bazate pe metode de testare validate și acceptate, pot fi utilizate pentru a evalua fiabilitatea și acuratețea altor metode similare (cunoscute în limbaj curent sub denumirea de teste „me-too”) bazate pe principii științifice similare și care măsoară sau estimează același efect biologic sau toxic (14).
2. Înainte de a adopta metode modificate (și anume, potențiale îmbunătățiri propuse pentru o metodă de testare aprobată), trebuie efectuată o evaluare în vederea stabilirii efectului modificărilor propuse asupra performanței testului și măsura în care astfel de modificări afectează informațiile disponibile pentru celelalte elemente componente ale procesului de validare. În funcție de numărul și de natura modificărilor propuse, datele generate și documentația corespunzătoare pentru modificările respective, procesul de validare este același ca și în cazul unui nou test sau, dacă este cazul, acesta este limitat la o evaluare a fiabilității și relevanței pe baza SP stabilite (14).
3. Fiabilitatea și acuratețea metodelor similare sau modificate propuse pentru utilizare în cadrul prezentei MT se evaluează cu ajutorul unor substanțe chimice reprezentând întreaga serie de rezultate ale LLNA. Pentru a evita utilizarea nejustificată a animalelor, se recomandă cu fermitate ca dezvoltatorii de modele să se consulte cu autoritățile corespunzătoare înainte de a demara studiile de validare în conformitate cu SP și cu orientarea furnizată în prezenta MT.
4. Standardele de performanță se bazează pe standardele armonizate ale Comitetului de coordonare inter-agenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA, ale Centrului European pentru validarea metodelor alternative (CE-ECVAM) al Comisiei Europene și ale Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (12), pentru evaluarea validității versiunilor similare sau modificate ale LLNA. Standardele de performanță conțin elementele esențiale ale metodei de testare, substanțele chimice de referință recomandate și standardele de acuratețe și fiabilitate pe care metoda propusă ar trebui să le respecte sau să le depășească.

**I. Elemente esențiale ale metodei de testare**

5. În vederea garantării faptului că o metodă LLNA similară sau modificată este similară din punct de vedere funcțional și structural cu metoda LLNA și că măsoară același efect biologic, în protocolul metodei de testare trebuie incluse următoarele elemente:

— substanța de test trebuie aplicată local pe ambele urechi ale șoarecelui;

— proliferarea limfocitelor se măsoară în ganglionii limfatici de drenare de la locul aplicării substanței de test;

— proliferarea limfocitelor trebuie măsurată în cursul etapei de inducție a sensibilizării dermice;



▼ **M3**

- în ceea ce privește substanțele de test, cea mai mare doză selectată trebuie să corespundă concentrației maxime care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece. Pentru substanțele de referință pozitive, doza maximă trebuie să fie mai mare sau egală cu valorile CE3 ale LLNA pentru substanțele chimice de referință corespunzătoare (a se vedea tabelul 1), fără a induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece;
- fiecare studiu include un vehicul martor concomitent și, dacă este cazul, utilizează, de asemenea, un martor pozitiv concomitent;
- grupul tratat trebuie să fie format din cel puțin patru animale;
- pot fi colectate fie date individuale, fie date colective privind animalele.

În cazul nerespectării unuia dintre aceste criterii, aceste standarde de performanță nu permit validarea metodei de testare similare sau modificate.

## II. **Lista minimală a substanțelor chimice de referință**

6. În cadrul standardelor de performanță armonizate ale Comitetului de coordonare inter-agenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA, ale Centrului European pentru validarea metodelor alternative (CE-ECVAM) al Comisiei Europene și ale Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (12), se regăsește un minimum de 18 substanțe chimice care trebuie utilizate și patru substanțe chimice de referință opționale. Aceste patru substanțe produc fie rezultate fals pozitive, fie fals negative în cadrul LLNA, ceea ce nu se întâmplă în cazul rezultatelor testelor pe om sau pe cobai (B.6 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13) și care permit, prin urmare, demonstrarea unei performanțe mai mari sau egale cu cea a LLNA. Criteriile de selecție pentru identificarea acestor substanțe sunt următoarele:
  - lista substanțelor de referință include tipurile de substanțe testate în mod obișnuit pentru potențialul de sensibilizare dermică, precum și gama de răspunsuri pe care LLNA le poate măsura și estima;
  - substanțele prezintă structuri chimice bine definite;
  - sunt puse la dispoziție, pentru fiecare substanță, date LLNA provenite de la teste pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13) și (unde a fost posibil) date provenite de la testele efectuate pe om; și
  - substanțele sunt disponibile în comerț.

Substanțele de referință recomandate sunt menționate în tabelul 1. Studiile care utilizează substanțele de referință propuse trebuie evaluate împreună cu vehiculul corespunzător indicat în tabelul 1. În situațiile în care o substanță enumerată nu este disponibilă, pot fi utilizate alte substanțe care îndeplinesc criteriile de selecție menționate, cu o justificare corespunzătoare.

Tabelul 1

## Substanțe de referință recomandate pentru standardele de performanță LLNA

| Număr | Substanțe chimice <sup>(1)</sup>  | Nr. CAS                  | Formă  | Veh <sup>(2)</sup> | CE3 % <sup>(3)</sup> | N <sup>(4)</sup> | 0,5x – 2,0x CE3 | Intervalul actual CE3 | LLNA vs. teste pe cobai | LLNA vs. teste pe om |
|-------|---|--------------------------|--------|--------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| 1     | 5-Cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-onă (MI) <sup>(5)</sup> | 26172-55-4/<br>2682-20-4 | Lichid | DMF                | 0,009                | 1                | 0,0045-0,018    | NC                    | +/+                     | +/+                  |
| 2     | DNCB  | 97-00-7                  | Solid  | AOO                | 0,049                | 15               | 0,025-0,099     | 0,02-0,094            | +/+                     | +/+                  |
| 3     | 4-Fenilendiamină  | 106-50-3                 | Solid  | AOO                | 0,11                 | 6                | 0,055-0,22      | 0,07-0,16             | +/+                     | +/+                  |
| 4     | Clorură de cobalt   | 7646-79-9                | Solid  | DMSO               | 0,6                  | 2                | 0,3-1,2         | 0,4-0,8               | +/+                     | +/+                  |
| 5     | Izoeugenol  | 97-54-1                  | Lichid | AOO                | 1,5                  | 47               | 0,77-3,1        | 0,5-3,3               | +/+                     | +/+                  |
| 6     | 2-mercaptobenzotiazol   | 149-30-4                 | Solid  | DMF                | 1,7                  | 1                | 0,85-3,4        | NC                    | +/+                     | +/+                  |
| 7     | Citral  | 5392-40-5                | Lichid | AOO                | 9,2                  | 6                | 4,6-18,3        | 5,1-13                | +/+                     | +/+                  |
| 8     | HCA   | 101-86-0                 | Lichid | AOO                | 9,7                  | 21               | 4,8-19,5        | 4,4-14,7              | +/+                     | +/+                  |
| 9     | Eugenol   | 97-53-0                  | Lichid | AOO                | 10,1                 | 11               | 5,05-20,2       | 4,9-15                | +/+                     | +/+                  |
| 10    | Benzoat de fenil  | 93-99-2                  | Solid  | AOO                | 13,6                 | 3                | 6,8-27,2        | 1,2-20                | +/+                     | +/+                  |
| 11    | Alcool cinamic  | 104-54-1                 | Solid  | AOO                | 21                   | 1                | 10,5-42         | NC                    | +/+                     | +/+                  |
| 12    | Imidazolidinil uree   | 39236-46-9               | Solid  | DMF                | 24                   | 1                | 12-48           | NC                    | +/+                     | +/+                  |
| 13    | Metacrilat de metil   | 80-62-6                  | Lichid | AOO                | 90                   | 1                | 45-100          | NC                    | +/+                     | +/+                  |
| 14    | Clorbenzen  | 108-90-7                 | Lichid | AOO                | 25                   | 1                | NA              | NA                    | -/-                     | -/ (*)               |
| 15    | Izopropanol   | 67-63-0                  | Lichid | AOO                | 50                   | 1                | NA              | NA                    | -/-                     | -/+                  |

## ▼ M3

| Număr | Substanțe chimice <sup>(1)</sup> | Nr. CAS  | Formă  | Veh <sup>(2)</sup> | CE3 % <sup>(3)</sup> | N <sup>(4)</sup> | 0,5x – 2,0x CE3 | Intervalul actual CE3 | LLNA vs. teste pe cobai | LLNA vs. teste pe om |
|-------|----------------------------------|----------|--------|--------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| 16    | Acid lactic                      | 50-21-5  | Lichid | DMSO               | 25                   | 1                | NA              | NA                    | –/–                     | –/ (*)               |
| 17    | Salicilat de metil               | 119-36-8 | Lichid | AOO                | 20                   | 9                | NA              | NA                    | –/–                     | –/–                  |
| 18    | Acid salicilic                   | 69-72-7  | Solid  | AOO                | 25                   | 1                | NA              | NA                    | –/–                     | –/–                  |

Substanțe opționale pentru demonstrarea performanței îmbunătățite în raport cu LLNA

|    |                           |           |        |      |      |   |           |          |         |     |
|----|---------------------------|-----------|--------|------|------|---|-----------|----------|---------|-----|
| 19 | Lauril sulfat de sodiu    | 151-21-3  | Solid  | DMF  | 8,1  | 5 | 4,05-16,2 | 1,5-17,1 | +/-     | +/- |
| 20 | Etilenglicol dimetacrilat | 97-90-5   | Lichid | MEK  | 28   | 1 | 14-56     | NC       | +/-     | +/+ |
| 21 | Xilen                     | 1330-20-7 | Lichid | AOO  | 95,8 | 1 | 47,9-100  | NC       | +/ (**) | +/- |
| 22 | Clorură de nichel         | 7718-54-9 | Solid  | DMSO | 5    | 2 | NA        | NA       | –/+     | –/+ |

Abrevieri: AOO = acetonă; ulei de măsline (4:1, v/v); nr. CAS = numărul de registru al *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N,N*-dimetilformamidă; DMSO = sulfoxid de dimetil; DNCB = dinitro-2,4-clorbenzen; EC3 = concentrația estimată necesară pentru a produce un indice de stimulare egal cu 3; GP = rezultatul testului pe cobai (și anume B. 6 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13); HCA = hexilcinamaldehydă; LLNA = Rezultatul testului pe ganglioni limfatici locali murini (și anume B.42 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 429) (1); MEK = metil etil cetonă; NA = nu se aplică deoarece indicele de stimulare < 3; NC = nu este calculat, deoarece datele au fost obținute dintr-un singur studiu; Veh = vehicul de test.

(\*) Presupus a fi un agent de non-sensibilizare la om având în vedere că nu au fost localizate rezultate ale testului clinic epicutanat, nu este inclus ca alergen în setul testului epicutanat și nu au fost localizate cazuri raportate de sensibilizare la om.

(\*\*) nu sunt disponibile date de la teste pe cobai.

<sup>(1)</sup> Substanțele chimice trebuie preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează acceptabilitatea stocării acestora.

<sup>(2)</sup> Ca urmare a impactului potențial al diferitelor vehicule asupra performanței LLNA, trebuie utilizat vehiculul recomandat pentru fiecare substanță de referință (24) (32).

<sup>(3)</sup> Valoarea medie, acolo unde au fost disponibile mai multe valori EC3. Pentru substanțele negative (cu indice de stimulare < 3), este furnizată cea mai mare concentrație testată.

<sup>(4)</sup> Numărul de studii LLNA în urma cărora au fost obținute datele.

<sup>(5)</sup> Disponibil sub formă comercială ca Kathon CG (nr. CAS 55965-84-9), care reprezintă un amestec de CMI și MI 3:1. Concentrațiile relative pentru fiecare componentă se situează între 1,1 % și 1,25 % (CMI), respectiv 0,3 % și 0,45 % (MI). Componentele inactivate sunt săruri de magneziu (21,5 %-24 %) și nitrat de cupru (0,15 %-0,17 %), restul preparatului fiind apă 74 %-77 %. Kathon CG este ușor accesibil prin intermediul Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (în prezent *Dow Chemical Corporation*).

▼ **M3****III. Standarde de fiabilitate și de acuratețe**

7. Precizia unei metode LLNA similare sau modificate trebuie să îndeplinească sau să depășească acuratețea standardelor de performanță LLNA în cadrul unei evaluări efectuate cu ajutorul celor 18 substanțe chimice de referință minimale care trebuie utilizate. Metoda nouă sau modificată trebuie să rezulte într-o clasificare corectă a substanțelor ca fiind pozitive sau negative pe baza unei decizii de tip „da/nu”. Cu toate acestea, metoda nouă sau modificată ar putea să nu clasifice corect toate substanțele de referință minime care trebuie utilizate. Dacă, spre exemplu, unul dintre agenții slabi de sensibilizare este incorect clasificat, testul poate fi considerat ca prezentând o performanță echivalentă, cu condiția furnizării unei justificări a clasificării eronate, precum și a unor date adiționale adecvate (de exemplu, rezultate ale testelor care furnizează clasificări corecte pentru alte substanțe cu proprietăți fizice, chimice și de sensibilizare similare cu cele ale substanței chimice de referință clasificate incorect). În astfel de circumstanțe, situația validării metodei de testare LLNA noi sau modificate trebuie evaluată pentru fiecare caz în parte.

*Reproductibilitatea intra-laborator*

8. Reproductibilitatea intra-laborator a unei metode LLNA noi sau modificate se determină cu ajutorul unei substanțe de sensibilizare caracterizată clar în cadrul LLNA. Prin urmare, SP LLNA se bazează pe variabilitatea rezultatelor testelor repetate cu hexilcinamaldehydă (HCA). Fiabilitatea intra-laborator se evaluează prin compararea valorilor minime ale concentrației estimate (CE<sub>m</sub>) obținute cu HCA în cadrul a patru teste repetate la interval de cel puțin o săptămână. Reproductibilitatea intra-laborator este considerată acceptabilă atunci când un laborator reușește să obțină valori ale CE<sub>m</sub> cuprinse între 5 % și 20 %, pentru fiecare test cu HCA, ceea ce corespunde unei valori de 0,5-2,0 ori media CE<sub>3</sub> prevăzută pentru HCA (10 %) în cadrul LLNA (a se vedea tabelul 1).

*Reproductibilitatea inter-laborator*

9. Reproductibilitatea inter-laborator a unei metode LLNA noi sau modificate se determină cu ajutorul a două substanțe de sensibilizare care sunt clar caracterizate în cadrul LLNA. SP LLNA se bazează pe variabilitatea rezultatelor testelor efectuate cu HCA și dinitro-2,4-clorbenzen (DNCB) în laboratoare diferite. Valorile CE<sub>m</sub> trebuie obținute în studii independente efectuate în cel puțin trei laboratoare separate. Reproductibilitatea inter-laborator este considerată acceptabilă atunci când fiecare laborator obține valori ale CE<sub>m</sub> cuprinse între 5 % și 20 % pentru fiecare test cu HCA și între 0,025 % și 0,1 % pentru DNCB, ceea ce corespunde unei valori de 0,5-2,0 ori media CE<sub>3</sub> prevăzută pentru HCA (10 %) și, respectiv, pentru DNCB (0,05 %) în cadrul LLNA (a se vedea tabelul 1).

## ▼ M3

## Apendicele 2

## Definiții

*Acuratețe:* Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (14).

*Substanță etalon:* O substanță de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigură (sigure); (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efectele cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

*Concentrație estimată minimă (CE<sub>m</sub>):* Concentrația estimată a unei substanțe de test necesară pentru a produce un indice de stimulare care indică un răspuns pozitiv.

*Concentrație estimată trei (CE<sub>3</sub>):* Concentrația estimată a unei substanțe de test necesară pentru a produce un indice de stimulare cu valoarea trei.

*Fals negativ:* O substanță de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, ea fiind de fapt pozitivă sau activă.

*Fals pozitiv:* O substanță de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, aceasta fiind de fapt negativă sau inactivă.

*Pericol:* Potențialul de efect negativ asupra mediului sau sănătății. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

*Reproductibilitate inter-laborator:* Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproducibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită, de asemenea, reproductibilitatea între laboratoare (14).

*Reproductibilitate intra-laborator:* O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (14).

*Test „me-too”:* O expresie colocvială utilizată pentru a denumi o metodă de testare care, din punct de vedere structural și funcțional, este similară cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. O astfel de metodă de testare ar putea face obiectul unei validări accelerate. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară (14).

*Valoare aberantă:* O valoare aberantă este o observație considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eșantion aleatoriu dintr-o populație.

*Standarde de performanță (SP):* Standarde, bazate pe o metodă de testare validată, care furnizează baza pentru evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse, similară din punct de vedere funcțional și mecanic. Sunt incluse: (i) componente esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimă a substanțelor de referință selectate dintre substanțele utilizate pentru a demonstra performanța acceptabilă a metodei de testare validate; și (iii) niveluri similare de acuratețe și fiabilitate, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă trebuie să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe de referință (14).

*Metodă de testare protejată:* O metodă de testare a cărei producere și distribuire sunt restricționate de brevete, drepturi de autor, mărci etc.

▼ **M3**

*Asigurarea calității:* Un proces de gestionare prin care aderarea la standardele și cerințele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor și acuratețea transferului de date sunt evaluate de persoane independente de cele care au efectuat testarea.

*Substanțe de referință:* Substanțe chimice selectate pentru utilizare în procesul de validare, pentru care răspunsurile la sistemul de testare de referință *in vitro* sau *in vivo* sau speciile studiate sunt deja cunoscute. Substanțele respective trebuie să fie reprezentative pentru clasele de substanțe chimice pentru care este preconizată utilizarea metodei de testare și trebuie să reprezinte toată gama de răspunsuri care pot fi preconizate de la substanțele pentru care ar putea fi folosite, de la puternic, la slab, la negativ. Ar putea fi necesare diferite seturi de substanțe chimice de referință pentru diferitele etape ale procesului de validare și pentru diferite metode de testare și diferite utilizări ale testului (14).

*Relevanță:* Descrierea relației dintre test și efectul studiat și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Ea reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateții (conformității) unei metode de testare (14).

*Fiabilitate:* Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (14).

*Sensibilizare dermică:* Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun ce poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

*Indice de stimulare (IS):* O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test care reprezintă raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate și cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

*Substanță de test (denumită, de asemenea, substanță chimică de test):* Orice substanță sau amestec testat prin utilizarea prezentei metode de testare.

*Metodă de testare validată:* Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv acuratețea) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al acurateții și fiabilității, încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (14).



## B.43. STUDII DE NEUROTOXICITATE PE ROZĂTOARE

### 1. METODĂ

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 424 (1997) a OCDE.

Această metodă de testare a fost elaborată în vederea obținerii informațiilor necesare pentru a confirma sau pentru a caracteriza mai eficient potențiala neurotoxicitate a unei substanțe la animale adulte. Poate fi utilizată împreună cu alte metode de testare în cadrul studiilor de toxicitate cu doză repetată sau în cadrul unui studiu separat. Se recomandă consultarea Liniilor directoare OCDE privind strategiile și metodele de testare a neurotoxicității (1) pentru elaborarea studiilor bazate pe această metodă de testare. Acest lucru este deosebit de important dacă se anticipează modificarea observațiilor și a procedurilor de testare recomandate în mod obișnuit pentru această metodă. Liniile directoare au fost elaborate pentru a facilita alegerea altor proceduri de testare care urmează să fie utilizate în împrejurări speciale.

Această metodă nu este destinată evaluării neurotoxicității asupra dezvoltării.

#### 1.1. INTRODUCERE

Pentru evaluarea caracteristicilor toxice ale produselor chimice trebuie avute în vedere posibilele efecte neurotoxice. Metoda de testare a toxicității sistemice cu doză repetată permite o primă triere a substanțelor care ar putea fi neurotoxice. Această metodă de testare poate fi utilizată pentru elaborarea unui studiu destinat obținerii de informații suplimentare privind efectele neurotoxice observate în cadrul studiilor de toxicitate sistemică cu doză repetată sau confirmării acestora. Cu toate acestea, în unele cazuri, potențiala neurotoxicitate a anumitor categorii de substanțe chimice poate fi evaluată în mod mai adecvat direct prin aplicarea acestei metode, fără colectarea în prealabil a indicațiilor care pot fi oferite de studiile de toxicitate sistemică cu doză repetată. Aici sunt incluse, de exemplu, cazurile în care:

- sunt observate semne de neurotoxicitate sau leziuni neuropatologice în cadrul studiilor de toxicitate, altele decât studiile de toxicitate sistemică cu doză repetată; sau
- substanțele prezintă asemănări de structură sau există alte informații privind existența unor caracteristici comune cu substanțe neurotoxice cunoscute.

În plus, utilizarea acestei metode poate fi adecvată și în alte cazuri; pentru mai multe informații a se vedea referința 1.

Această metodă a fost elaborată astfel încât să poată fi adaptată în funcție de diverse nevoi specifice privind confirmarea neurotoxicității histopatologice și comportamentale a unei substanțe chimice, precum și pentru a oferi o caracterizare și o cuantificare a reacției neurotoxice.

## ▼B

În trecut, neurotoxicitatea era asimilată unei neuropatii implicând leziuni neuropatologice sau disfuncții neurologice, cum ar fi convulsiile, paralizia sau tremorul. Deși neuropatia reprezintă o manifestare importantă a neurotoxicității, în prezent este evident că mai există multe alte semne de toxicitate la nivelul sistemului nervos (de exemplu pierderea coordonării motorii, deficiențe senzoriale, diminuarea capacității de învățare și a memoriei) care nu sunt întotdeauna evidențiate de studiile asupra neuropatiei sau de alte tipuri de studii.

Această metodă de testare a neurotoxicității a fost elaborată în vederea detectării efectelor neurocomportamentale și neuropatologice importante la rozătoare adulte. Deși efectele la nivelul comportamentului pot indica un impact negativ asupra organismului chiar și în absența unor modificări morfologice, nu toate modificările la nivelul comportamentului sunt specifice sistemului nervos. În consecință, toate modificările observate trebuie evaluate având în vedere și datele histopatologice, hematologice sau biochimice corespundente, precum și datele privind alte tipuri de toxicitate sistemică. Testele care trebuie realizate în cadrul acestei metode pentru caracterizarea și cuantificarea reacțiilor neurotoxice cuprind proceduri histopatologice și comportamentale specifice care pot fi completate prin investigații electrofiziologice și/sau biochimice (1) (2) (3) (4).

Substanțele neurotoxice pot acționa asupra mai multor ținte din cadrul sistemului nervos prin mai multe mecanisme. Deoarece nu se poate elabora o singură serie de teste care să permită o evaluare aprofundată a potențialului neurotoxic al tuturor substanțelor, poate fi necesară și efectuarea altor teste *in vivo* sau *in vitro* specifice tipurilor de neurotoxicitate studiate sau preconizate.

Această metodă de testare poate fi utilizată, de asemenea, împreună cu indicațiile prevăzute în Liniile directe OCDE privind strategiile și metodele de testare a neurotoxicității (1) în vederea elaborării de studii destinate unei mai bune caracterizări și cuantificări a relației doză-efect pentru o mai bună estimare a nivelului concentrației la care nu se observă niciun efect advers sau pentru a pune în evidență pericolele cunoscute sau potențiale prezentate de substanța respectivă. De exemplu, pot fi elaborate studii destinate identificării și evaluării mecanismului sau mecanismelor neurotoxice sau completării datelor deja obținute prin protocoalele de observație neurocomportamentale și neuropatologice de bază. Prin aceste studii nu trebuie să se încerce obținerea acelorași date care ar fi obținute oricum prin utilizarea protocoalelor standard recomandate pentru această metodă dacă datele respective sunt deja disponibile și nu sunt considerate necesare pentru interpretarea rezultatelor studiului.

Informațiile oferite de acest test de neurotoxicitate, efectuat independent sau în combinație cu alte teste, permit:

- determinarea caracterului permanent sau reversibil al efectelor substanței chimice asupra sistemului nervos;
- o mai bună caracterizare a alterărilor de la nivelul sistemului nervos asociate expunerii la substanța chimică și o mai bună înțelegere a mecanismelor care stau la baza acestora;



## ▼B

— determinarea relației doză-efect și timp-efect în vederea estimării nivelului concentrației la care nu se observă niciun efect advers (care se poate utiliza pentru stabilirea criteriilor de siguranță pentru substanța chimică respectivă).

În cadrul acestei metode de testare, substanța de testat se administrează pe cale orală. Dacă sunt mai adecvate alte căi de administrare (de exemplu dermică sau prin inhalare), este posibil să se impună și modificarea procedurilor recomandate. Alegerea căii de administrare depinde de tipul expunerii la om și de informațiile toxicologice și cinetice disponibile.

## 1.2. DEFINIȚII

**Efect advers:** orice alterare față de nivelul de referință provocată de tratament și care reduce capacitatea de supraviețuire, de reproducere sau de adaptare la mediu a organismului.

**Doză:** cantitatea de substanță de testat administrată. Doza se exprimă ca greutate (g, mg) a substanței de testat sau ca greutate a substanței de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență (de exemplu mg/kg) sau sub formă de concentrație alimentară constantă (ppm).

**Dozare:** termen general care desemnează doza administrată, frecvența și durata administrării.

**Neurotoxicitate:** modificare adversă a structurii sau a funcției sistemului nervos provocată de expunerea la un agent chimic, biologic sau fizic.

**Substanță neurotoxică:** orice agent chimic, biologic sau fizic care poate provoca neurotoxicitate.

**NOAEL:** abrevierea pentru nivelul dozei fără efect advers vizibil; reprezintă nivelul cel mai mare al dozei la care nu se observă niciun efect advers provocat de tratament.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se administrează pe cale orală sub forma mai multor doze mai multor grupuri de rozătoare de experiență. În general, se administrează doze repetate, în cadrul unui regim de dozare de 28 de zile, subcronic (90 de zile) sau cronic (1 an sau mai mult). Procedura descrisă în cadrul acestei metode poate fi utilizată și pentru studiile de neurotoxicitate acută. Animalele sunt testate în vederea detectării sau a caracterizării anomaliilor comportamentale și/sau neurologice. Pe parcursul fiecărei perioade de observație se evaluează diferite aspecte ale comportamentului care pot fi afectate de substanțe neurotoxice. La sfârșitul testului se perfuzează *in situ* animale de fiecare sex din fiecare grup și li se recoltează în vederea preparării și a examinării secțiuni din creier, din măduva spinării și din nervii periferici.

Dacă studiul se realizează independent în vederea depistării neurotoxicității sau a caracterizării efectelor neurotoxice, animalele din fiecare grup care nu sunt utilizate pentru perfuzare și pentru examenul histopatologic ulterior (a se vedea tabelul 1) pot fi utilizate pentru diferite proceduri neurocomportamentale, neurochimice sau electrofiziologice pe baza cărora se pot completa datele colectate în cadrul examinărilor standard impuse de această metodă (1). Aceste examinări suplimentare pot fi deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice sau efectele anticipate sugerează un tip specific de neurotoxicitate sau o țință a neurotoxicității substanței. Restul animalelor pot fi, de asemenea, utilizate pentru evaluări de tipul celor din cadrul metodelor de testare din studiile de toxicitate cu doză repetată pe rozătoare.

**▼B**

Dacă procedurile din cadrul acestei metode sunt combinate cu cele din cadrul altor metode, trebuie să se prevadă un număr de animale suficient pentru realizarea observațiilor impuse de ambele studii.

#### 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

##### 1.4.1. Alegerea speciei de animale

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, deși se pot utiliza și alte specii, dacă se justifică alegerea. Se folosesc rase de experiență, alegându-se animale adulte tinere și sănătoase. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie însărcinate. Administrarea dozelor trebuie să înceapă cât mai curând posibil după înțarcare, preferabil înainte ca animalele să împlinească vârsta de șase săptămâni și în orice caz înainte de atingerea vârstei de nouă săptămâni. Cu toate acestea, dacă acest studiu se realizează în combinație cu altele, este posibil să fie necesară ajustarea acestei limite de vârstă. La începutul studiului diferențele de greutate dintre animalele utilizate nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex. Dacă se realizează un studiu de scurtă durată cu doză repetată ca test preliminar pentru un studiu pe termen lung, în ambele studii se folosesc animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

##### 1.4.2. Condiții de adăpostire și de hrănire

Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin  $30\%$  și preferabil să nu depășească  $70\%$  decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul pentru umiditate este ca aceasta să fie de  $50\text{--}60\%$ . Iluminatul trebuie să fie artificial, și se alternează  $12$  ore de lumină și  $12$  ore de întuneric. Sunetele puternice intermitente trebuie reduse la minimum. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de faptul că în acesta trebuie adăugată și substanța de testat, dacă se administrează prin această metodă. Animalele pot fi găzduite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex.

##### 1.4.3. Pregătirea animalelor

Se aleg aleatoriu animale tinere și sănătoase care se împart în grupul tratat și în grupul martor. Cuștile trebuie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Animalele se marchează individual astfel încât să poată fi identificate și se păstrează în cuști timp de cel puțin  $5$  (cinci) zile înainte de începerea studiului pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator.

##### 1.4.4. Căile de administrare și pregătirea dozelor

În cadrul acestei metode substanța de testat se administrează pe cale orală. Substanța de testat se poate administra prin gavaj, prin alimentație, prin apă potabilă sau prin capsule. Se pot utiliza și alte căi de administrare (de exemplu dermică sau prin inhalare), dar este posibil să fie necesară modificarea procedurilor recomandate. Alegerea căii de administrare depinde de tipul expunerii la om și de informații toxicologice și cinetice disponibile. Alegerea căii de administrare precum și eventualele modificări aduse procedurilor din cadrul acestei metode de testare trebuie justificate.

**▼B**

Dacă este necesar, substanța de testat se poate dizolva sau suspenda într-un vehicul adecvat. Se recomandă utilizarea de soluții sau suspensii apoase, și numai dacă acest lucru nu este posibil, utilizarea de soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) sau, ca soluție de ultimă instanță, utilizarea de soluții/suspensii în care se folosesc alte vehicule. Proprietățile toxice ale vehiculului trebuie să fie cunoscute. În plus, trebuie avute în vedere și următoarele caracteristici ale vehiculului: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței de testat care i-ar putea afecta caracteristicile toxice și efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului.

## 1.5. PROCEDURA DE TESTARE

### 1.5.1. Numărul și sexul animalelor

Dacă studiul se realizează independent, se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) pentru fiecare grup tratat sau grup martor pe care se vor realiza observații clinice și funcționale. La sfârșitul studiului, dintre cei zece masculi și cele zece femele se selectează cel puțin cinci masculi și cinci femele care sunt perfuzați *in situ* și supuși unui examen neuro-histopatologic detaliat. Dacă se observă doar un număr limitat de animale dintr-un grup tratat în vederea detectării efectelor neurotoxice, animalele în cauză trebuie să fie printre cele perfuzate. Dacă studiul se realizează împreună cu un studiu de toxicitate cu doză repetată, se folosește un număr adecvat de animale care permite îndeplinirea obiectivelor ambelor studii. În tabelul 1 este indicat numărul minim de animale din fiecare grup necesar pentru diferite combinații de studii. Dacă este prevăzută sacrificarea unor animale înainte de finalizarea studiului sau constituirea unor grupuri pe care să se observe reversibilitatea efectelor, persistența sau survenirea efectelor toxice cu întârziere după tratare, sau dacă se preconizează realizarea unor observații suplimentare, numărul de animale trebuie majorat astfel încât să fie suficient pentru efectuarea observațiilor și a examenelor histopatologice.

### 1.5.2. Grupul tratat și grupul martor

Ca regulă generală, trebuie să existe cel puțin trei grupuri tratate, dar dacă din evaluarea altor date disponibile rezultă că administrarea repetată a unei doze de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi nu are niciun efect, se poate realiza un test-limită. Dacă nu sunt disponibile date adecvate, se poate realiza un studiu preliminar destinat stabilirii nivelurilor dozelor care trebuie utilizate. Exceptând tratamentul cu substanța de testat, animalele din grupul martor se tratează în mod identic cu animalele din grupul tratat. Dacă substanța de testat se administrează cu ajutorul unui vehicul, grupul martor trebuie să primească, de asemenea, un volum de vehicul egal cu cel mai mare volum utilizat pentru grupul tratat.

### 1.5.3. Verificarea fiabilității

Laboratorul care realizează studiul trebuie să prezinte date care demonstrează capacitatea sa de a realiza studiul și sensibilitatea metodelor utilizate. Aceste date trebuie să dovedească posibilitatea de detectare și cuantificare, după caz, a diferitelor criterii recomandate, de exemplu reacții neurovegetative, reactivitate senzorială, forță de prehensiune și activitate motorie. Referințele 2-9 conțin informații privind substanțele care provoacă diferite tipuri de reacții neurotoxice și care pot fi utilizate ca substanțe martor pozitiv. Se pot utiliza și date istorice, cu condiția ca elementele principale ale procedurilor de testare să rămână aceleași. Se recomandă actualizarea periodică a datelor istorice. De fiecare dată când laboratorul modifică un element esențial al testelor sau al metodelor trebuie să se obțină date noi care să demonstreze că sensibilitatea procedurii se menține.

**▼B****1.5.4. Alegerea dozei**

Nivelurile dozelor trebuie alese având în vedere toate datele disponibile privind toxicitatea și cinetica substanței de testat sau ale substanțele înrudite. Se alege cea mai mare doză pentru a provoca efecte neurotoxice sau efecte de toxicitate sistemică evidente. În continuare se alege o serie de doze descrescătoare pentru a se pune în evidență o eventuală relație doză-efect și absența nivelului dozei fără efect advers vizibil (NOAEL) la cel mai mic nivel al dozei. În principiu nivelurile dozelor trebuie alese astfel încât efectele neurotoxice primare de la nivelul sistemului nervos să poată fi deosebite de efectele legate de toxicitatea sistemică. Cea mai bună soluție constă de multe ori din alegerea a două sau trei intervale, iar adăugarea unui al patrulea interval este adesea preferabilă utilizării unor intervale foarte mari (de exemplu care depășesc factorul 10) între dozaje. Dacă există estimări realiste privind expunerea umană, acestea trebuie, de asemenea, luate în considerare.

**1.5.5. Testul-limită**

Dacă un studiu cu o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi realizat în conformitate cu metoda descrisă anterior nu provoacă niciun efect neurotoxic observabil și dacă datele privind compoziții cu structură asemănătoare sugerează că este puțin probabil ca substanța să fie toxică, se poate considera că nu este necesară realizarea unui studiu cu trei niveluri de dozare. În funcție de expunerea umană anticipată, este posibil să fie necesară mărirea dozei orale administrate în cadrul testului-limită. Pentru celelalte căi de administrare, cum sunt inhalarea și aplicarea dermică, nivelul maxim posibil de expunere este adesea determinat de proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat. Pentru studiile orale acute, doza din cadrul testului-limită trebuie să fie de cel puțin 2 000 mg/kg.

**1.5.6. Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța de testat în fiecare zi, șapte zile pe săptămână, timp de cel puțin 28 de zile; administrarea timp de cinci zile pe săptămână sau alegerea unei perioade mai scurte de expunere trebuie justificate. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj, animalele trebuie să primească o doză unică, introdusă cu ajutorul unei sonde gastrice sau al unei canule de intubație adecvate. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalelor de experiență. Acest volum nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală. Cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase se pot utiliza până la 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive care produc efecte exacerbate în concentrații mai mari, variațiile volumului administrat trebuie reduse la minimum prin ajustarea concentrației astfel încât să se mențină un volum constant la toate nivelurile dozei.

În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile este important ca bilanțul nutrițional sau hidric normal să nu fie afectat de cantitatea de substanță utilizată. Dacă substanța de testat se administrează prin hrană, există două posibilități: fie sub forma unei concentrații constante în alimentație (ppm), fie sub forma unei doze constante în raport cu greutatea corporală a animalului; trebuie să se precizeze alternativa utilizată. Dacă substanța se administrează prin gavaj, doza se administrează în fiecare zi aproximativ la aceeași oră, și se ajustează după cum este necesar pentru a menține un nivel constant al dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Dacă se realizează un studiu cu doză repetată ca studiu preliminar în vederea realizării unui studiu pe termen lung, în cadrul ambelor studii trebuie să se folosească regimuri alimentare similare. În cadrul studiilor de toxicitate acută, dacă nu se poate administra o doză unică, aceasta poate fi administrată în părți mai mici pe parcursul unei perioade de cel mult 24 de ore.

**▼B****1.6. OBSERVAȚII****1.6.1. Frecvența observațiilor și a testelor**

În cadrul studiilor cu doză repetată, perioada de observație trebuie să acopere întreaga perioadă de tratament. În cadrul studiilor de toxicitate acută, observațiile se realizează pe parcursul unei perioade de 14 zile post-tratament. Și animalele din grupurile satelit care nu sunt expuse pe parcursul unei perioade post-tratament trebuie observate pe parcursul aceleiași perioade.

Observațiile trebuie să fie suficient de frecvente pentru a maximiza probabilitatea de detectare a oricărui anomalii comportamentale și/sau neurologice. Observațiile se realizează de preferință în fiecare zi la aceeași oră, având în vedere și perioada pe parcursul căreia se estimează că efectele anticipate ale tratamentului sunt mai pronunțate. Tabelul 2 conține informații privind frecvența observațiilor clinice și a testelor funcționale. Dacă există date cinetice sau de altă natură obținute în cadrul unor studii anterioare care sugerează că sunt mai adecvate alte momente ale zilei pentru observații, teste sau pentru observațiile post-tratament, se adoptă un alt program care să permită colectarea cât mai multor informații posibil. Modificările programului trebuie justificate.

**1.6.1.1. *Supravegherea stării generale de sănătate și a mortalității/morbidității***

Se examinează minuțios toate animalele cel puțin o dată pe zi, verificându-se starea lor de sănătate, iar mortalitatea și morbiditatea se verifică de două ori pe zi.

**1.6.1.2. *Observații clinice detaliate***

Toate animalele selectate pentru a fi supuse unor examinări clinice detaliate (a se vedea tabelul 1) sunt supuse acestei examinări o dată înainte de prima expunere (pentru a permite realizarea de comparații pe același individ) și în continuare la diferite intervale, în funcție de durata studiului (a se vedea tabelul 2). Grupurile satelit pe care se studiază reversibilitatea efectelor sunt supuse unei examinări detaliate la sfârșitul perioadei de recuperare. Aceste examinări se efectuează într-o zonă standard, situată în afara cuștii în care se află animalele de obicei. Rezultatele se consemnează cu atenție, prin utilizarea unor sisteme de cotare incluzând criterii sau scale de cotare pentru fiecare dintre măsurătorile efectuate. Criteriile și scalele utilizate trebuie definite în mod explicit de către laboratorul care efectuează testul. Sunt necesare eforturi pentru a reduce la minimum variațiile condițiilor de testare (cu excepția celor legate de tratament) și pentru ca examinările să fie realizate de observatori experimentați care nu au fost informați cu privire la tratamentul administrat.

Se recomandă o abordare structurată, în cadrul căreia fiecărui animal studiat să i se aplice sistematic criterii clar definite (inclusiv definiția „intervalului” normal) la fiecare examinare. „Intervalul normal” se documentează în mod adecvat. Se înregistrează toate semnele observate. Dacă este posibil, se înregistrează și magnitudinea semnelor observate. Observațiile clinice vizează, dar nu în mod limitativ, modificările la nivelul pielii, blânii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și reacțiile neurovegetative (de exemplu secreții lacrimale, piloerecție, dimensiunea pupilei, respirație neobișnuită și/sau respirație pe gură, urinare și/sau defecație neobișnuită, de exemplu decolorarea urinei).

## ▼B

Se consemnează și toate reacțiile neobișnuite legate de poziția corpului, de nivelul de activitate (de exemplu explorarea mai intensă sau mai redusă a zonei standard) și de coordonarea mișcărilor. Se consemnează, de asemenea, modificările mersului (de exemplu, mers legănat, ataxie), modificările posturii (de exemplu, cocoșe) și reacțiile la manipulare, la locul în care se află și la alți stimuli din mediu, precum și prezența unor mișcări clonice sau tonice, a convulsiilor sau a tremorului, comportamentul stereotip (de exemplu, curățarea excesivă, mișcări neobișnuite ale capului, mișcări circulare repetate) precum și comportamentele bizare (de exemplu, mușcături, lins excesiv, automutilare, mers înapoi, emiterea de sunete) sau agresivitatea.

1.6.1.3. *Teste funcționale*

Ca și observațiile clinice detaliate, testele funcționale se realizează pe toate animalele selecționate în acest scop (a se vedea tabelul 1) o dată înainte de expunere, iar apoi periodic. Frecvența testelor funcționale depinde și de durata studiului (a se vedea tabelul 2). Pe lângă perioadele de observare prevăzute în tabelul 2, se realizează și observații funcționale pe grupurile satelit, cât mai aproape de momentul sacrificării. Testele funcționale studiază reactivitatea senzorială la diferiți stimuli [de exemplu auditivi, vizuali și proprioceptivi (5) (6) (7)], forța de prehensiune (8) și activitatea motorie (9). Activitatea motorie se măsoară cu ajutorul unui dispozitiv automat care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității. Dacă se folosește un alt sistem anume, acesta trebuie să fie cantitativ, și să aibă o sensibilitate și o fiabilitate demonstrate. Fiecare dispozitiv se testează pentru a asigura fiabilitatea sa în timp și coerența rezultatelor obținute cu ajutorul diferitelor dispozitive. Referințele relevante conțin informații suplimentare privind procedurile care pot fi utilizate. Dacă nu există date (de exemplu, informații privind legătura dintre structură și activitate, date epidemiologice, alte studii toxicologice) privind potențialele efecte neurotoxice, trebuie avute în vedere teste mai specializate pentru explorarea funcțiilor senzorială și motorie sau a memoriei și a capacității de învățare. Referința (1) conține informații suplimentare privind teste mai specializate și utilizarea acestora.

În mod excepțional, animalele care prezintă semne marcate de toxicitate care ar putea afecta considerabil testul funcțional pot fi eliminate din cadrul acestui test. Eliminarea animalelor din cadrul unui test funcțional trebuie justificată.

1.6.2. **Greutatea corporală și consumul de hrană/apă**

În cadrul studiilor cu o durată de până la 90 de zile, toate animalele se cântăresc cel puțin o dată pe săptămână și se măsoară, de asemenea, și consumul de hrană (sau consumul de apă, dacă substanța de testat se administrează pe această cale) cel puțin săptămânal. În cadrul studiilor pe termen lung, toate animalele sunt cântărite cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată la 4 săptămâni. Se măsoară și consumul de hrană (sau consumul de apă, dacă substanța de testat se administrează pe această cale) cel puțin săptămânal pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi la intervale de aproximativ trei luni, cu excepția cazurilor în care trebuie procedat altfel din cauza stării de sănătate sau a greutății corporale.

**▼B****1.6.3. Examenul oftalmologic**

În cadrul studiilor cu o durată de peste 28 de zile, înainte de administrarea substanței de testat și la sfârșitul studiului, se realizează un examen oftalmologic cu ajutorul unui oftalmoscop sau al unui instrument echivalent adecvat, de preferință la toate animalele sau cel puțin la animalele din grupul căruia i-a fost administrată doza cea mai mare și la animalele din grupurile martor. Dacă se detectează modificări la nivelul ochilor sau dacă semnele clinice sugerează că este necesar, se examinează toate animalele. În cadrul studiilor pe termen lung se realizează și un examen oftalmologic la 13 săptămâni. Examenul oftalmologic nu sunt necesare dacă există deja date disponibile obținute în cadrul altor studii cu durată și doze similare.

**1.6.4. Hematologie și biochimie clinică**

În cazul studiilor de neurotoxicitate realizate în combinație cu un studiu de toxicitate sistemică cu doză repetată, examinările hematologice și determinările biochimice clinice se realizează în conformitate cu metoda utilizată în cadrul studiului de toxicitate sistemică. Probele se prelevează astfel încât să se reducă la minimum orice potențiale efecte asupra comportamentului neurologic.

**1.6.5. Histopatologie**

Examenul neuropatologic trebuie elaborat astfel încât să vină în completarea observațiilor realizate în etapa *in vivo* a studiului și să le aprofundeze. Se fixează *in situ* țesuturi de la cel puțin 5 animale/sex/grup (a se vedea tabelul 1 și paragraful următor) utilizându-se tehnicile obișnuite de perfuzare și de fixare (a se vedea referința 3, capitolul 5 și referința 4, capitolul 50). Se înregistrează toate modificările observabile importante. Dacă studiul se realizează independent în vederea depistării neurotoxicității sau pentru caracterizarea efectelor neurotoxice, restul animalelor pot fi utilizate fie pentru examinarea comportamentului neurologic (10) (11), pentru examinări neuropatologice (10) (11) (12) (13), neurochimice (10) (11) (14) (15) sau electrofiziologice (10) (11) (16) (17) în completarea procedurilor și a examinărilor descrise sau pot fi incluse între animalele supuse examenului histopatologic, măbind numărul acestora. Aceste proceduri suplimentare sunt deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice sau efectele anticipate sugerează un tip specific de neurotoxicitate sau o țință a neurotoxicității (2) (3). Restul animalelor pot fi, de asemenea, utilizate pentru evaluările patologice de rutină din cadrul metodei utilizate în studiile cu doză repetată.

Toate probele de țesut acoperite cu parafină sunt supuse unei proceduri obișnuite de colorație, de exemplu colorație hematoxilina-eozină, și examinate la microscop. Dacă se observă semne de neuropatii periferice sau dacă există suspiciuni în acest sens, se examinează probe de țesut nervos periferic acoperite cu plastic. Semnele clinice pot recomanda, de asemenea, examinarea altor zone sau utilizarea unor proceduri speciale de colorație. Referințele 3 și 4 conțin informații privind alte zone care pot fi examinate suplimentar. Coloranții speciali pot fi utili și pentru evidențierea unor tipuri specifice de modificări patologice (18).

**▼B**

Se realizează și un examen histologic pe secțiuni reprezentative din sistemul nervos central și periferic (a se vedea referința 3, capitolul 5 și referința 4, capitolul 50). În mod normal zonele examinate includ: creierul anterior, centrul emisferelor cerebrale, inclusiv o secțiune din hipocamp, creierul central, cerebelul, puntea lui Varolio, bulbul rahidian, ochiul împreună cu nervul optic și retina, măduva spinării și protuberanțele cervicale și lombare, ganglionii din rădăcina posterioară, fibrele din rădăcinile posterioară și anterioară, nervul sciatic proximal, nervul tibial proximal (la nivelul genunchiului) și ramificațiile nervului tibial în mușchii gambei. Secțiunile din măduva spinării și din nervii periferici trebuie să fie atât transversale cât și longitudinale. Se acordă o atenție specială vascularizării sistemului nervos. Trebuie examinată și o probă de mușchi scheletici, în special de la nivelul gambei. Se acordă o atenție specială regiunilor din sistemul nervos central și din sistemul nervos periferic care au o structură celulară și fibroasă despre care se știe că sunt afectate în mod special de substanțele neurotoxice.

Referințele (3) și (4) conțin informații privind alterările neuropatologice tipice provocate de expunerea la substanțe neurotoxice. Se recomandă o examinare în etape a probelor de țesut, în cadrul căreia probele prelevate de la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai mare sunt comparate cu probele prelevate de la grupul martor. Dacă nu este identificată nicio alterare neuropatologică pe baza probelor de la aceste grupuri, nu mai sunt necesare alte analize. Dacă se observă alterări neurologice la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai mare, trebuie codate și examinate succesiv probe din toate țesuturile care pot fi afectate, prelevate de la grupurile cărora li s-au administrat doza intermediară și doza cea mai redusă.

Dacă prin examinarea calitativă se evidențiază alterări neuropatologice, se realizează o a doua examinare a tuturor regiunilor sistemului nervos care prezintă astfel de alterări. Se realizează secțiuni din toate regiunile care pot fi afectate de la toate grupurile tratate, și se examinează aleatoriu fără a se cunoaște codul. Se înregistrează frecvența și gravitatea tuturor leziunilor. După evaluarea tuturor regiunilor pentru toate grupurile tratate, se poate realiza decodarea și se efectuează o analiză statistică în vederea determinării relației doză-răspuns. Trebuie descrise diversele niveluri de gravitate pentru fiecare leziune.

Rezultatele examenului neuropatologic se evaluează având în vedere observațiile și măsurătorile privind comportamentul, precum și alte date obținute prin studii de toxicitate sistemică anterioare sau concomitente asupra substanței de testat.

## 2. **DATE**

### 2.1. **PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Rezultatele sunt indicate pentru fiecare animal în parte. Pe lângă aceasta, toate rezultatele sunt recapitulate într-un tabel care indică, pentru fiecare test sau grup martor, numărul de animale de la începutul testului, numărul de animale care au murit în timpul testului sau care au fost sacrificate în conformitate cu principiul minimei suferințe, momentul morții sau al sacrificării cu minimă suferință, numărul animalelor care prezentau semne de toxicitate, descrierea semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul apariției, durata, tipul și gravitatea efectelor toxice, numărul de animale care au prezentat leziuni, inclusiv tipul și gravitatea acestora.



**▼B****2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Rezultatele studiului se evaluează în vederea stabilirii frecvenței, a gravității și pentru corelarea efectelor neuropatologice și de comportament (și a efectelor neurochimice și electrofiziologice dacă se realizează examinări suplimentare) și a altor efecte adverse observate. Dacă este posibil, rezultatele numerice se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Metodele statistice se aleg în etapa în care este conceput studiul.

**3. RAPORT****RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

- natura fizică (inclusiv izomerizare, puritate, proprietăți fizice și chimice);
- date de identificare.

Vehiculul (dacă este cazul):

- justificarea alegerii vehiculului.

Animale de experiență:

- specia/rasa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa animalelor, condițiile de adăpostire, aclimatizare, regimul alimentar etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

- detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- precizări privind dozele administrate, inclusiv privind vehiculul, volumul și forma fizică a materialului administrat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea dozei alese;
- justificarea căii și a duratei de expunere alese;
- transformarea concentrației substanței de testat administrate prin hrană/apa potabilă (ppm) în doză efectivă (mg/kilogram greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei.

Proceduri de observație și de testare:

- detalii privind repartizarea de animale din fiecare grup în sub-grupul perfuzat;
- detalii privind sistemele de evaluare, inclusiv criterii și scale de evaluare utilizate pentru fiecare măsurătoare din cadrul observațiilor clinice detaliate;

**▼B**

- detalii privind testele funcționale de explorare a reactivității senzoriale la diverși stimuli (de exemplu auditivi, vizuali și proprioceptivi); detalii privind evaluarea forței de prehensiune; detalii privind evaluarea activității motorii (inclusiv privind dispozitivele automate pentru detectarea activității) și detalii privind celelalte proceduri utilizate;
- date privind examenul oftalmologic și, dacă este cazul, examenele hematologice și testele de biochimie clinică, cu indicarea nivelurilor de referință relevante;
- detalii privind procedurile specifice de cercetare a modificărilor neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice.

## Rezultate:

- greutatea corporală/modificările acesteia, inclusiv greutatea la sacrificare;
- consumul de alimente și, după caz, de apă;
- reacția toxică pe sexe și pe doză, inclusiv semnele de toxicitate sau mortalitatea;
- natura, gravitatea și durata (momentul apariției și durata ulterioară) efectelor clinice observate (indiferent dacă sunt sau nu reversibile);
- descrierea detaliată a rezultatelor tuturor testelor funcționale;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor modificărilor neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice, dacă există;
- date privind absorbția și metabolismul, dacă există;
- tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul.

## Discutarea rezultatelor:

- informații privind relația doză-răspuns;
- legătura dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței de testat;
- nivelul concentrației la care nu se observă niciun efect advers.

## Concluzii:

- se încurajează furnizarea unei aprecieri privind neurotoxicitatea globală a substanței de testat.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. In preparation.
2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.
4. Spencer, P. S. and Schauraburg, H. H. (1980). Spencer, P. S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 726-742.

## ▼B

5. Tupper D. E. and Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
6. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
7. Moser V. C., McDaniel, K. M. and Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
8. Meyer O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C. and Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
9. Crofton, K. M., Haward, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reirer, L. W., Tilson, H. A. and MacPhail, R. C. (1991) Inter-laboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. teratol.*, 13, 599-609.
10. Tilson, H. A., and Mitchell, C. L. eds. (1992), *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
11. Chang, L. W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker. New York.
12. Broxup, B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689-695.
13. Moser, V. C., Anthony, D. C., Sette, W. F. and MacPhail, R. C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343-352.
14. O'Callaghan J. P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 445-452.
15. O'Callaghan J. P. and Miller, D. B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368-378.
16. Fox, D. A., Lowndes, H. E. and Birkamper, G. G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299-335.
17. Johnson, B. L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
18. Bancroft, J. D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques, Chapter 17, *Neuropathological Techniques*, Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tabelul 1

**Numărul minim de animale necesare pe grup pentru studiile de neurotoxicitate realizate separat sau în combinație cu alte studii**

|   | STUDIU DE NEUROTOXICITATE REALIZAT: |  |  |  |
|---|-------------------------------------|--|--|--|
|   | Separat                             | În combinație cu un studiu de 28 de zile | În combinație cu un studiu de 90 de zile | În combinație cu un studiu de toxicitate cronică |
| Număr total de animale pe grup  | 10 masculi și 10 femele             | 10 masculi și 10 femele                  | 15 masculi și 15 femele                  | 25 masculi și 25 femele                          |
| Număr de animale selectate pentru testele funcționale, inclusiv pentru observații clinice detaliate   | 10 masculi și 10 femele             | 10 masculi și 10 femele                  | 10 masculi și 10 femele                  | 10 masculi și 10 femele                          |
| Număr de animale selectate pentru perfuzarea <i>in situ</i> și examinare neuro-histopatologică  | 5 masculi și 5 femele               | 5 masculi și 5 femele                    | 5 masculi și 5 femele                    | 5 masculi și 5 femele                            |
| Număr de animale selectate pentru studii cu doză repetată/subcronice/de toxicitate cronică, examinări hematologice, de biochimie clinică, histopatologie etc. conform dispozițiilor din <i>Linia directoare</i> relevantă |                                     | 5 masculi și 5 femele                    | 10 masculi † și 10 femele †              | 20 masculi † și 20 femele †                      |
| Observații suplimentare, după caz   | 5 masculi și 5 femele               |  |  |  |

† Aici sunt incluse cinci animale selectate pentru teste funcționale și observații clinice detaliate din cadrul studiului de neurotoxicitate.



Tabelul 2

## Frecvența observațiilor clinice și a testelor funcționale

| Tipul observațiilor                                  |                              | Durata studiului  |  |   |  |
|--|------------------------------|---|--|---|--|
|  |                              | Acut  | 28 de zile   | 90 de zile  | Cronic   |
| La toate animalele                                   | Stare generală de sănătate   | zilnic  | zilnic   | zilnic  | zilnic   |
|  | Mortalitate/<br>morbiditate  | de două ori pe zi   | de două ori pe zi  | de două ori pe zi   | de două ori pe zi  |
| La animalele selectate pentru observații funcționale | Observații clinice detaliate | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— în termen de 8 ore de la administrarea dozei, în momentul estimat al efectului maxim</li> <li>— în zilele 7 și 14 după administrarea dozei</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— săptămânal în continuare</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— o dată în prima sau a doua săptămână de după expunere</li> <li>— lunar în continuare</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— o dată la sfârșitul primei luni de expunere</li> <li>— la fiecare trei luni în continuare</li> </ul> |
|  | Teste funcționale            | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— în termen de 8 ore de la administrarea dozei, în momentul estimat al efectului maxim</li> <li>— în zilele 7 și 14 după administrarea dozei</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— în a patra săptămână de tratament, cât mai aproape posibil de sfârșitul perioadei de expunere</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— o dată în prima sau a doua săptămână de după expunere</li> <li>— lunar în continuare</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— înainte de prima expunere</li> <li>— o dată la sfârșitul primei luni de expunere</li> <li>— la fiecare trei luni în continuare</li> </ul> |

**▼B****B.44. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA *IN VIVO*****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 427 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Expunerea la multe produse chimice are loc în principal prin piele în timp ce majoritatea studiilor toxicologice efectuate pe animale în laboratoare folosesc administrarea pe cale orală. Studiul asupra absorbției percutanate *in vivo* descris în metoda de față asigură conexiunea necesară pentru a extrapola rezultatele studiilor realizate prin administrare orală atunci când se realizează evaluări în materie de siguranță după expunerea cutanată.

O substanță trebuie să traverseze un număr mare de straturi celulare ale pielii înainte să pătrundă în sânge. Pentru cele mai multe substanțe, stratul care determină proporția de absorbție este stratul cornos compus din celule moarte. Permeabilitatea cutanată depinde atât de lipofilicitatea unor produși chimici și de grosimea stratului extern al epidermei, cât și de factori precum greutatea moleculară și concentrația substanței. În general, pielea șobolanilor și a iepurilor are o permeabilitate mai mare decât cea a oamenilor, în timp ce porcușorii de guineea și maimuțele au pielea asemănătoare cu cea a oamenilor.

Metodele pentru măsurarea absorbției percutanate pot fi împărțite în două categorii: *in vivo* și *in vitro*. Metoda *in vivo* este capabilă să furnizeze informații corespunzătoare asupra absorbției cutanate la diferite animale de laborator. Mult mai recent dezvoltate, metodele *in vitro* utilizează transportul parțial sau total prin stratul de piele umană sau animală până la un rezervor de fluid. Metoda *in vitro* este descrisă separat, în cadrul unei alte metode de testare (1). Pentru a alege metoda cea mai adecvată într-o situație dată, se recomandă să se consulte documentul de orientare al OCDE pentru realizarea de studii privind absorbția cutanată (2) care furnizează mai multe detalii privind relevanța metodelor *in vivo* și *in vitro*.

Metoda *in vivo*, descrisă în prezenta metodă, permite determinarea adâncimii de pătrundere prin piele a substanței de testare, în compartimentul sistemic. Tehnica a fost folosită la scară largă timp de mulți ani (3) (4) (5) (6) (7). Deși studiile cu privire la absorbția percutanată *in vitro* pot fi adecvate în multe cazuri, există situații în care doar un studiu *in vivo* poate să asigure informațiile necesare.

Avantajele metodei *in vivo* sunt următoarele: utilizarea unui sistem intact din punct de vedere fiziologic și metabolic, utilizarea unei specii comune multor studii de toxicitate și posibilitatea de modificare în vederea utilizării cu alte specii. Dezavantajele sunt: utilizarea animalelor vii, utilizarea materialului marcat radioactiv pentru a facilita fiabilitatea rezultatelor, dificultăți în determinarea fazei de absorbție precoce și diferențele de permeabilitate între pielea umană și cea a speciilor preferate (șobolani). Pielea animalelor este în general mai permeabilă, ceea ce poate duce la o supraestimare a absorbției percutanate la om (6) (8) (9). Substanțele caustice/corosive nu trebuie testate pe animale vii.

**▼B**

## 1.2. DEFINIȚII

**Doza neabsorbită** reprezintă cantitatea de substanță eliminată prin curățare de pe suprafața pielii după expunere și oricare altă cantitate prezentă pe pansamentul nonocluziv, inclusiv orice cantitate volatilizată de pe suprafața pielii în timpul expunerii.

**Doza absorbită (*in vivo*)** reprezintă cantitatea de substanță prezentă în urină, în reziduurile colectate la curățarea cuștii, în fecale, în aerul expirat (dacă este măsurat), în sânge, țesuturi (dacă sunt colectate) și pe carcasa rămasă, după îndepărtarea pielii corespunzătoare zonei de aplicare.

**Doza absorbabilă** reprezintă cantitatea de substanță prezentă pe piele sau în piele după curățare.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța testată, de preferință marcată radioactiv, este aplicată pe pielea rasă a animalelor în regim de dozaj normal sau adecvat, sub forma unui preparat caracteristic folosit în mod curent. Preparatul de testare rămâne în contact cu pielea o perioadă de timp stabilită sub pansament corespunzător (nonocluziv, semiocluziv sau ocluziv) pentru a preveni ingerarea acestuia. La finalul perioadei de expunere, pansamentul este îndepărtat și pielea este curățată cu agent de curățare adecvat, pansamentul și materialul folosit pentru aplicarea agentului de curățare sunt păstrate pentru analiză și se aplică un pansament nou. Înainte, în timpul și după perioada de expunere, animalele sunt adăpostite în cuști individuale metabolice, iar excrețiile și aerul expirat, pe parcursul acestor perioade, sunt colectate pentru analiză. Colectarea aerului expirat poate fi omisă dacă există suficiente informații care să confirme absența sau formarea în cantități limitate a unui metabolit volatil radioactiv. Fiecare studiu necesită în mod normal mai multe grupuri de animale care vor fi expuse la preparatul de testare. La finalul perioadei de expunere, animalele dintr-un lot sunt eutanasiate. Ulterior și alte loturi de animale sunt eutanasiate la intervale de timp planificate (2). La finalul perioadei de prelevare, animalele rămase sunt eutanasiate, sângele este colectat pentru analiză, zona folosită pentru aplicare este prelevată pentru analiză și carcasa este analizată pentru a găsi substanțele neexcretate. Se examinează probele prin mijloace adecvate și se estimează gradul de absorbție percutanată (6) (8) (9).

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.4.1. Selectarea speciei de animale

Specia cea mai des utilizată este șobolanul, dar pot fi folosite, de asemenea, speciile fără păr sau cele care au rata de absorbție cutanată mai apropiată de rata de absorbție la om (3) (6) (7) (8) (9). Se utilizează animale adulte tinere, sănătoase, de același sex (de regulă masculi), dintre speciile folosite de obicei în laborator. La începutul studiului, variația greutatei animalelor utilizate nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie. De exemplu, se utilizează șobolani masculi cu greutatea cuprinsă între 200 și 250 g, în special șobolanii cu greutatea situată spre limita superioară a acestui interval.

**▼B****1.4.2. Numărul și sexul animalelor**

Pentru fiecare preparat de testare și fiecare programată se utilizează un lot de cel puțin patru animale de același sex. Fiecare lot de animale este eutanasiat la intervale de timp diferite, de exemplu la sfârșitul perioadei de expunere (de obicei 6 sau 24 de ore) și la sfârșitul altor perioadelor (de exemplu, 48 și 72 de ore). Dacă există date disponibile care să ateste diferențe semnificative între masculi și femele în ceea ce privește nivelul de toxicitate dermică, se alege sexul cel mai sensibil. Dacă nu există asemenea date, atunci se pot folosi animale de orice sex.

**1.4.3. Condiții de adăpostire și de hrănire**

Temperatura din camera experimentală trebuie să fie de 22 °C ( $\pm 3$  °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, succesiunea fiind de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. În timpul studiului și de preferință în perioada de aclimatizare, animalele sunt adăpostite în cuști metabolice separate. Din moment ce hrana și apa vărsate ar compromite rezultatele, riscurile unor astfel de evenimente trebuie reduse.

**1.4.4. Pregătirea animalelor**

Animalele sunt marcate pentru a permite identificarea individuală și sunt ținute în cuști timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea studiului pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator.

După perioada de aclimatizare și cu aproximativ 24 de ore înainte de dozare, pielea fiecărui animal va fi rasă pe o porțiune din zona omoplaților și spatelui. Proprietățile de permeabilitate ale pielii vătămate sunt diferite de proprietățile de permeabilitate ale pielii intacte; prin urmare, este necesară o atenție sporită pentru a nu zgâria pielea. După operațiunea de radere și cu aproximativ 24 de ore înainte ca substanța de testare să fie aplicată pe piele (a se vedea punctul 1.4.7) suprafața pielii trebuie ștersă cu acetona pentru a îndepărta sebumul. Nu se recomandă spălarea suplimentară cu apă și săpun deoarece orice depunere de săpun poate facilita absorbția substanței de testare. Suprafața trebuie să fie suficient de mare, de preferință de cel puțin 10 cm<sup>2</sup>, pentru a permite calcularea cantității de substanță chimică absorbită pe cm<sup>2</sup> de piele. Această suprafață este practicabilă în cazul șobolanilor cu greutatea de 200-250 g. După pregătire, animalele sunt repuse în cuștile metabolice.

**1.4.5. Substanța de testare**

Substanța de testare reprezintă produsul ale cărui caracteristici de penetrare urmează să fie studiate. În mod ideal, substanța de testare trebuie să fie marcată radioactiv.

**1.4.6. Preparatul de testare**

Preparatul de testare (de exemplu material pur, diluat sau amestec care conține substanța chimică de testare aplicată pe piele) trebuie să fie același (sau un înlocuitor realist) cu preparatul la care pot fi expuși oamenii sau alte posibile specii țintă. Orice variație de la preparatul utilizat trebuie justificată. Atunci când este necesar, substanța de testare este dizolvată sau pusă într-o suspensie într-un mediu corespunzător. Caracteristicile de absorbție și interacțiunea potențială cu substanța de testare trebuie cunoscute, pentru medii altele decât apa.



## ▼B

1.4.7. **Aplicarea pe piele**

Pe suprafața pielii se delimitează o zonă de aplicare de dimensiuni specifice. Ulterior, o cantitate cunoscută din preparatul de testare este uniform aplicată pe zona respectivă. În mod normal, această cantitate trebuie să simuleze expunerea umană potențială, de obicei 1-5 mg/cm<sup>2</sup> pentru solide și până la 10 μl/cm<sup>2</sup> pentru lichide. Orice alte cantități trebuie justificate prin condițiile de utilizare preconizate, obiectivele experimentului sau caracteristicile fizice ale preparatului de testare. După aplicare, zona tratată trebuie protejată astfel încât animalul să nu poată să se curețe. Figura 1 prezintă un exemplu de dispozitiv utilizat în acest scop. În mod normal, zona de aplicare este protejată printr-un pansament nonocluziv (de exemplu un pansament permeabil de tifon din nailon). Totuși, pentru aplicații nelimitate, zona de aplicare trebuie protejată cu un pansament ocluziv. În cazul în care de evaporarea substanțelor de testare semivolatile reduce gradul de recuperare al substanței de testare până la un nivel inacceptabil (a se vedea punctul 1.4.10, primul paragraf), este necesar să se capteze substanță evaporată într-un filtru de cărbune care acoperă dispozitivul de aplicare (a se vedea figura 1). Este important ca niciun dispozitiv să nu producă vătămări ale pielii, să nu absoarbă sau să nu reacționeze cu preparatul de testare. Animalele sunt aduse înapoi în cuștile individuale metabolice pentru colectarea excrementelor.

1.4.8. **Durata expunerii și recoltarea probelor**

Durata expunerii reprezintă intervalul de timp cuprins între aplicarea și îndepărtarea preparatului de testare prin spălarea pielii. Se utilizează o perioadă de expunere relevantă (de obicei de 6 sau 24 de ore), în funcție de durata de expunere umană presupusă. După perioada de expunere, animalele sunt ținute în cuștile metabolice până la termenul prevăzut. În timpul perioadei de studiu, animalele trebuie ținute sub observație la intervale regulate, pentru depistarea simptomelor de toxicitate/reacții anormale. La sfârșitul perioadei de expunere, pielea tratată trebuie cercetată pentru depistarea semnelor vizibile de iritație.

Cuștile metabolice trebuie să faciliteze colectarea separată a urinei și fecalelor pe tot parcursul studiului. Ele trebuie să permită, de asemenea, colectarea de dioxid de carbon <sup>14</sup>C și compuși de carbon <sup>14</sup>C volatili, care trebuie analizați atunci când sunt produși într-o cantitate (> 5 %). Urina, fecalele și fluidele recuperate (de exemplu dioxid de carbon <sup>14</sup>C și compuși de carbon <sup>14</sup>C volatili) trebuie colectate individual de la fiecare lot la fiecare interval de recoltare a probelor. Dacă există suficiente informații că nu se formează niciun metabolit volatil radioactiv sau că este prezent în cantități mici, se pot utiliza cuști deschise.

Excrementele sunt colectate pe parcursul perioadei de expunere, până la 24 de ore de la contactul inițial cu pielea și ulterior în fiecare zi până la finalul experimentului. În mod normal, trei intervale de colectare a excrementelor sunt suficiente, dar, în funcție de scopul preconizat pentru preparatul de testare sau de datele cinetice existente, poate fi necesar să se prevadă intervale de timp suplimentare sau adaptate pentru studiu.

La sfârșitul perioadei de expunere, dispozitivul de protecție este îndepărtat de la fiecare animal și păstrat separat pentru analiză. Pielea tratată a tuturor animalelor trebuie spălată de cel puțin trei ori cu agent de curățare folosind tampoane adecvate. Trebuie evitată contaminarea celorlalte părți ale corpului. Agentul de curățare trebuie să fie reprezentativ pentru practicile de igienă normale (de exemplu, soluție apoasă de săpun). La final, pielea trebuie uscată. Toate tampoanele și materialele de curățare trebuie păstrate pentru analiză. Animalelor din loturile stabilite pentru observații ulterioare li se aplică, înainte de repunerea în cuștile individuale, un pansament nou pentru a proteja zona tratată.

**▼B****1.4.9. Proceduri finale**

Pentru fiecare lot, fiecare animal trebuie eutanasiat la momentul de timp prevăzut, iar sângele trebuie colectat pentru analiză. Dispozitivul protector sau pansamentul trebuie îndepărtate pentru analiză. Pielea din zona de aplicare și o suprafață similară de piele rasă pe care nu s-a aplicat nicio substanță trebuie prelevate de la fiecare animal pentru o analiză separată. Zona de aplicare poate fi fracționată pentru separarea stratului cornos de epiderma de bază pentru a furniza mai multe informații asupra dispunerii substanței chimice. Determinarea acestei dispunerii pe parcursul unui interval de timp, după perioada de expunere, trebuie să furnizeze indicii asupra comportamentului oricărei substanțe chimice în stratul cornos. Pentru a facilita fracționarea pielii (după spălarea finală a pielii și eutanasierea animalului), se îndepărtează orice pansamentul protector. Pielea din zona de aplicare, împreună cu o suprafață de piele circulară din jurul zonei de aplicare este prelevată și fixată în ace pe o planșetă. Pe suprafața de piele se aplică o fâșie de bandă adezivă exercitând o presiune moderată și se îndepărtează banda o dată cu stratul cornos. Se aplică fâșii succesive de bandă până când banda respectivă nu mai aderă la suprafața de piele, atunci când toată porțiunea de strat cornos a fost îndepărtată. Toate fâșiile de bandă adezivă, care provin de la același animal, pot fi amestecate într-un singur recipient în care se adaugă un digestiv de țesut pentru a solubiliza stratul cornos. Se pot îndepărta orice țesuturi-țintă potențiale pentru măsurători separate înainte ca carcasa rămasă să fie analizată pentru determinarea dozei absorbite. Carcasele animalelor sunt reținute pentru analiză. O analiză a conținutului total este de obicei suficientă. Organele țintă pot fi îndepărtate pentru analiză separată (dacă acest lucru este indicat de către alte studii). Urina prezentă în vezică în momentul planificat pentru eutanasiere se adaugă la urina colectată anterior. După colectarea excrementelor din cuștile metabolice în momentul planificat pentru eutanasiere, cuștile și trapele lor trebuie spălate cu un solvent corespunzător. Se analizează, în egală măsură, orice alt echipament potențial contaminat.

**1.4.10. Analiza**

În toate studiile trebuie să se obțină un nivel adecvat de recuperare (respectiv o medie de  $100 \pm 10\%$  de radioactivitate). Recuperările în afara acestui interval trebuie justificate. Cantitatea dozei administrate în fiecare mostră trebuie analizată prin proceduri validate în mod corespunzător.

Considerațiile de natură statistică trebuie să includă o măsurare a variației testelor repetate pentru fiecare aplicație.

**2. DATE**

Pentru fiecare animal, la fiecare interval de prelevare trebuie efectuate următoarele măsurători pentru depistarea substanței chimice de testare și/sau a metaboliților. În afară de datele individuale, datele grupate în funcție de intervalele de prelevare se raportează sub formă de medii:

— cantitatea asociată cu dispozitivele de protecție;

— cantitatea care poate fi îndepărtată de pe piele;

— cantitatea din/de pe piele care nu poate fi spălată;

**▼B**

- cantitatea prezentă în probele de sânge;
- cantitatea din excremente și aerul expirat (dacă este cazul);
- cantitatea care rămâne în carcasă și orice organe îndepărtate pentru analiză separată.

Cantitatea de substanță de testare și/sau metaboliții din excremente, din aerul expirat, din sânge și din carcasă permit determinarea cantității totale absorbite la fiecare interval de timp. De asemenea, se poate calcula cantitatea de substanță chimică de testare absorbită pe cm<sup>2</sup> de piele expusă la substanța de testare pe parcursul perioadei de expunere.

### 3. **RAPORT**

#### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă cerințele stipulate în protocolul de testare, inclusiv o justificare pentru sistemul de testare utilizat și trebuie să cuprindă următoarele:

Substanța de testare:

- date de identificare [număr CAS, dacă este disponibil, sursă, puritate (puritatea radiochimică), impurități cunoscute, număr lot];
- stare fizică, proprietăți fizico-chimice (de exemplu pH, volatilitate, solubilitate, stabilitate, greutate moleculară și coeficientul de partiție octanol/apă – log  $P_{ow}$ )

Pregătirea testului:

- formularea și justificarea utilizării;
- detalii referitoare la pregătirea testului, cantitatea aplicată, concentrațiile obținute, mijloacele, stabilitatea și omogenitatea.

Animalele testate:

- speciile/rasele utilizate;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- proveniența animalelor, condiții de adăpostire, diete, etc;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condițiile de testare:

- detalii cu privire la administrarea preparatului de testare (zonă de aplicare, metode de tastare, ocluzie/non-ocluzie, volum, extracție, detectare);
- detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

Rezultate:

- orice semne de toxicitate;
- date privind absorbția, prezentate sub formă de tabel (exprimate ca rată, cantitate sau procent);

**▼B**

- recuperări totale ale experimentului;
- interpretarea rezultatelor, comparație cu alte date disponibile privind absorbția percutanată a substanței de testare.

Discutarea rezultatelor.

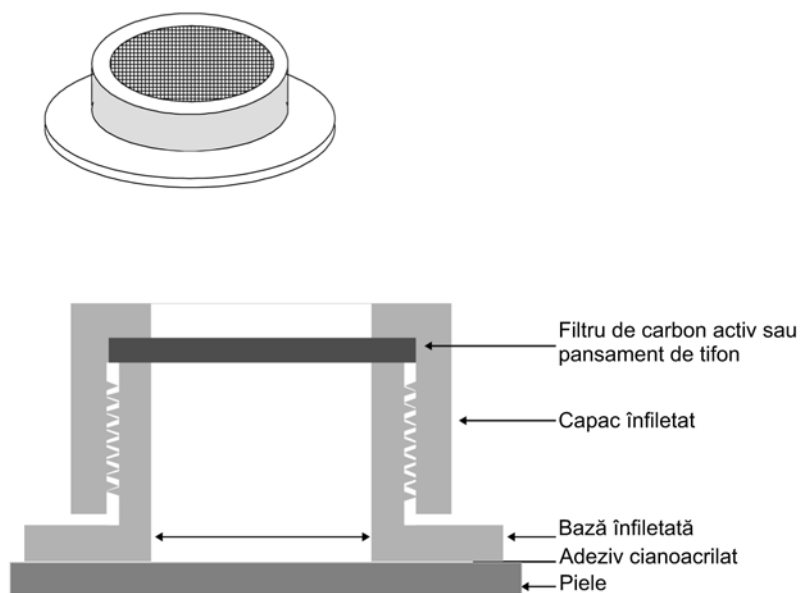
Concluzii.

#### 4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.
2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.
5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.
9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

**▼ B***Figura 1*

Exemplu de dispozitiv clasic utilizat pentru delimitarea și protejarea zonei de aplicare în timpul studiilor de absorbție percutanată *in vivo*





## B.45. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA DE TESTARE *IN VITRO*

### 1. METODĂ

Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 428 (2004) a OCDE.

#### 1.1. INTRODUCERE

Prezenta metodă a fost concepută pentru a furniza informații cu privire la absorbția unei substanțe de testare aplicată pe un eșantion de piele excizată. Metoda poate fi folosită fie în combinație cu metoda de absorbție cutanată: metoda *in vivo* (1), fie separat. În vederea elaborării studiilor bazate pe prezenta metodă se recomandă consultarea documentului de orientare al OCDE pentru realizarea de studii privind absorbția cutanată (2). Documentul de orientare a fost elaborat pentru a facilita alegerea procedurilor *in vitro* adecvate utilizării în situații specifice, care să asigure fiabilitatea rezultatelor obținute cu ajutorul acestei metode.

Metodele de măsurare a absorbției cutanate și a expunerii dermice pot fi împărțite în două categorii: *in vivo* și *in vitro*. Metodele *in vivo* de măsurare a absorbției cutanate sunt bine cunoscute și furnizează date farmacokinetice în cazul mai multor specii de animale. Metoda *in vivo* este descrisă separat în cadrul unei alte metode de testare (1). Metodele *in vitro* au fost utilizate timp de mai mulți ani pentru măsurarea absorbției cutanate. Cu toate că nu s-au efectuat studii de validare a metodelor *in vitro* incluse în prezenta metodă de testare, experții OCDE au stabilit în 1999 că există suficiente date evaluate pentru susținerea metodei *in vitro* (3). Documentul de orientare (2) furnizează detalii suplimentare care fundamentează această decizie, printre care și un număr important de comparații directe între metodele *in vitro* și *in vivo*. Există o serie de monografii care tratează acest subiect și prezintă un context amănunțit al utilizării metodei *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Metodele *in vitro* măsoară difuzia substanțelor chimice în piele și prin piele până la un rezervor de fluid; acestea utilizează eșantioane de piele neviabilă, pentru a măsura doar difuzia sau eșantioane de piele proaspătă, activă din punct de vedere metabolic, pentru a măsura simultan difuzia și metabolismul cutanat. Astfel de metode sunt folosite pentru a compara absorbția, în piele și prin piele, a diferite formule de substanțe chimice, furnizând în același timp modele utile pentru evaluarea absorbției percutanate la om.

Metoda *in vitro* nu se poate aplica în toate cazurile sau clasele de substanțe chimice, dar poate fi folosită pentru o evaluare preliminară calitativă a penetrației cutanate. În anumite cazuri poate fi nevoie și de completarea acestora cu datele *in vivo*. Se recomandă consultarea documentului de orientare (2) pentru a stabili situațiile în care utilizarea metodei *in vitro* este adecvată. Referința (3) furnizează informații detaliate suplimentare pentru a facilita luarea unei decizii.

Prezenta metodă prezintă principiile generale pentru măsurarea absorbției cutanate și a difuziei unei substanțe de testare folosind un eșantion de piele excizată. Se poate folosi piele de la multe specii mamifere, inclusiv de la om. Proprietățile de permeabilitate ale pielii se păstrează după excizie pentru că obstacolul principal în calea difuziei este stratul cornos neviabil; nu s-a identificat nicio formă de transport activ al substanțelor chimice prin piele. S-a observat că pielea posedă capacitatea de metabolizare a unor substanțe chimice în timpul absorbției percutanate (6), însă acest proces nu limitează proporția dozei reale absorbite, deși poate afecta natura substanței care intră în fluxul sanguin.

## ▼B

## 1.2. DEFINIȚII

**Doză neabsorbită:** reprezintă cantitatea de substanță eliminată prin curățare de la suprafața pielii după expunere, precum și oricare altă cantitate prezentă pe pansamentul neocluziv, inclusiv orice cantitate volatilizată de pe suprafața pielii în timpul expunerii.

**Doză absorbită (*in vitro*):** masă de substanță de testare care ajunge la fluidul receptor sau în circulația sistemică într-o perioadă de timp stabilită.

**Doză absorbabilă (*in vitro*):** reprezintă cantitatea de substanță prezentă pe piele sau în piele după curățare.

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testare, marcată radioactiv după caz, este aplicată pe suprafața unui eșantion de piele care separă cele două camere ale unei celule de difuzie. Înainte de a fi îndepărtată printr-o procedură corespunzătoare de curățare, substanța chimică rămâne pe piele în condiții specifice și pentru o perioadă determinată de timp. Fluidul receptor este prelevat la intervale stabilite în cursul perioadei de testare și analizat pentru a căuta substanța de testare și/sau metaboliți.

Atunci când sunt utilizate sisteme metabolic active, metaboliții substanței chimice de testare pot fi analizați utilizând metode corespunzătoare. La sfârșitul experimentului se cuantifică distribuția substanței chimice de testare și a metaboliților.

Absorbția substanței de testare pe o perioadă de timp determinată este măsurată cu ajutorul analizei fluidului receptor și a pielii tratate, în condițiile corespunzătoare descrise în cadrul prezentei metode și în documentul de orientare (2). Dacă nu se poate demonstra că absorbția poate fi determinată numai cu ajutorul valorilor fluidului receptor, substanța de testare rămasă în piele trebuie considerată ca și absorbită. Analiza altor componente (materialul curățat de pe piele și cel rămas în straturile pielii) permite continuarea evaluării datelor, inclusiv evacuarea totală a substanței de testare și procentajul de recuperare.

Pentru a demonstra funcționarea și fiabilitatea sistemului de testare în laborator în care se efectuează studiul, trebuie să fie disponibile rezultatele obținute pentru substanțele chimice de referință, în concordanță cu literatura de specialitate referitoare la metoda folosită. Această cerință poate fi îndeplinită prin testarea unei substanțe de referință corespunzătoare (care prezintă, de preferință, o lipofilicitate apropiată de substanța de testare) în paralel cu substanța de testare sau prin furnizarea unui istoric adecvat al datelor referitoare la un anumit număr de substanțe de referință cu lipofilicitate diferită (de exemplu cofeină, acid benzoic și testosteron).

## 1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.4.1. Celula de difuzie

Celula de difuzie este formată dintr-o cameră donatoare și o cameră receptoare, grefa de piele fiind așezată între acestea (un exemplu de model tipic este prezentat în figura 1). Celula trebuie să asigure o etanșare perfectă în jurul pielii, să permită o prelevare ușoară și amestecare bună a soluției receptoare în contact cu partea inferioară a pielii, precum și o bună supraveghere a temperaturii din celulă și a conținutului acesteia. Sunt acceptate celule de difuzie atât statice, cât și dinamice. În mod normal, camerele donatoare sunt lăsate deschise în timpul expunerii la o doză limitată dintr-un preparat de testare. Totuși, camerele donatoare pot fi închise pentru aplicații nelimitate și în anumite cazuri cu doze limitate.

**▼B****1.4.2. Fluidul receptor**

Se preferă folosirea unui fluid receptor care favorizează fenomenele fiziologice, deși se pot folosi și alte fluide, cu condiția ca acestea să fie justificate. Se furnizează compoziția exactă a fluidului receptor. Se demonstrează solubilitatea corespunzătoare a substanței chimice de testare în fluidul receptor, astfel încât aceasta să nu acționeze ca o barieră pentru absorbție. În plus, fluidul receptor nu trebuie să afecteze integritatea de preparare a pielii. Într-un sistem dinamic, viteza de scurgere nu trebuie să împiedice difuzia substanței de testare în fluidul receptor. Într-un sistem celular static, fluidul trebuie amestecat continuu și recoltat în mod regulat. Dacă se studiază metabolismul, fluidul receptor trebuie să întrețină viabilitatea pielii pe parcursul experimentului.

**1.4.3. Preparatul de piele**

Se poate folosi piele de origine umană sau animală. Se cunoaște faptul că folosirea pielii umane este supusă considerentelor și condițiilor etice naționale și internaționale. Deși se preferă pielea viabilă, se poate folosi și piele neviabilă, cu condiția ca integritatea pielii să poată fi demonstrată. Se acceptă atât membrane epidermice (separate enzimatic, termic sau chimic), cât și eşantioane de piele cu grosime limitată (în mod tipic, cu grosimea cuprinsă între 200-400 µm) prelucrată cu un dermatom. Se poate folosi piele cu grosime integrală, însă trebuie evitată folosirea grosimii excesive (aproximativ > 1 mm), cu excepția cazului în care este necesar pentru determinarea substanței chimice din straturile de piele. Trebuie explicată selecția speciilor, zona anatomică și tehnica de preparare. Trebuie furnizate date acceptabile de la minimum patru mostre pentru fiecare preparat de testare.

**1.4.4. Integritatea preparatului de piele**

Este esențial ca pielea să fie preparată în mod adecvat. Manevrarea incorectă poate duce la deteriorarea stratului cornos, așadar trebuie verificată integritatea pielii preparate. Atunci când se studiază metabolismul pielii, pielea excizată proaspăt trebuie folosită cât mai repede posibil și în condiții despre care se știe că favorizează activitatea metabolică. În general, pielea proaspăt excizată trebuie folosită în termen de 24 de ore, însă perioada acceptabilă de stocare poate varia în funcție de sistemul enzimatic implicat în metabolism și de temperaturile de stocare (13). Atunci când preparatele de piele au fost stocate înainte de utilizare, trebuie dovedit că și-au păstrat funcția de barieră.

**1.4.5. Substanța de testare**

Substanța de testare reprezintă produsul ale cărui caracteristici de penetrare urmează să fie studiate. În mod ideal, substanța de testare este marcată radioactiv.

**1.4.6. Preparatul de testare**

Preparatul de testare (de exemplu materialul pur, diluat sau amestec care conține substanța de testare aplicată pe piele) trebuie să fie același (sau un înlocuitor realist) cu preparatul la care pot fi expuși oamenii sau alte specii țintă posibile. Orice variație de la preparatul utilizat trebuie justificată.



**▼B****1.4.7. Concentrațiile și formulele substanțelor de testare**

În mod normal se folosesc mai multe concentrații ale substanței de testare, astfel încât să se acopere valorile superioare din gama de expuneri potențiale în cazul oamenilor. În egală măsură, se poate lua în considerare testarea unei serii de formule tipice.

**1.4.8. Aplicarea pe piele**

În condiții normale, omul este supus expunerilor la substanțe chimice în doze limitate. Prin urmare, se folosește o aplicare care simulează expunerea umană, în mod normal de 1-5 mg/cm<sup>2</sup> de piele pentru solide și până la 10 μl/cm<sup>2</sup> pentru lichide. Cantitatea este explicată de condițiile presupuse de folosire, de obiectivele studiului sau de caracteristicile fizice ale preparatului de testare. De exemplu, aplicările pe suprafața pielii pot fi nelimitate atunci când se aplică volume mari pe unitate de suprafață.

**1.4.9. Temperatura**

Difuzia pasivă a substanțelor chimice (prin urmare și absorbția acestora în piele) este afectată de temperatură. Camera de difuzie și pielea trebuie menținute la o temperatură constantă apropiată de temperatura normală a pielii de  $32 \pm 1$  °C. În funcție de modele de celule, temperatura băii sau blocului încălzit poate varia, pentru a asigura respectarea normei fiziologice a receptorului/pielii. Se preferă ca umiditatea să fie între 30 și 70 %.

**1.4.10. Durata expunerii și prelevarea**

Expunerea pielii la preparatul de testare poate avea loc pe durata întregului experiment sau pe o perioadă mai scurtă (pentru a imita un anumit tip de expunere a omului). Pielea se curăță de surplusul de preparat de testare cu ajutorul unui agent de curățare corespunzător, iar materialul rezultat în urma curățării este colectat pentru analiză. Procedura de eliminare a preparatului de testare depinde de condițiile de utilizare prevăzute și trebuie să fie justificată. O caracterizare adecvată a profilului de absorbție necesită, în mod normal, o perioadă de 24 de ore de prelevare a probelor. Perioadele de prelevare nu trebuie să depășească în mod normal 24 de ore, deoarece integritatea pielii poate începe să se deterioreze. În cazul substanțelor de testare care penetrează pielea rapid nu este nevoie de această perioadă de 24 de ore, însă în cazul substanțelor care penetrează încet, poate fi nevoie de perioade mai lungi de timp. Frecvența de prelevare a fluidului receptor ar trebui să permită prezentarea grafică a profilului de absorbție a substanței de testare.

**1.4.11. Proceduri finale**

Trebuie analizate toate componentele sistemului de testare (camera donatoare, materialul rezultat în urma curățării suprafeței de piele, preparatul de piele și camera receptoare/fluidul receptor), iar rata de recuperare trebuie determinată. În unele cazuri, pielea poate fi fracționată în zona de piele expusă și zona de piele sub marginea celei și în fracțiuni de strat cornos, epidermă și dermă destinate unei analize separate.

**1.4.12. Analiza**

În toate studiile trebuie să se obțină un nivel adecvat de recuperare (respectiv o medie de  $100 \pm 10$  % de radioactivitate) Recuperările în afara acestui interval trebuie justificate. Cantitatea de substanță de testare din fluidul receptor, din preparatul de piele, din materialul rezultat în urma curățării suprafeței pielii și din resturile din dispozitiv sunt analizate printr-o procedură corespunzătoare.

**▼B**

2.

**DATE**

Se prezintă analiza fluidului receptor, distribuția substanței chimice testate în sistemul de testare și profilul absorbției în timp. Atunci când are loc expunerea la doze limitate, se calculează cantitatea curățată prin spălare de pe piele, cantitatea prezentă în piele (inclusiv în diferite straturi de piele, în cazul în care există o analiză) și cantitatea prezentă în fluidul receptor (rata și cantitatea sau procentul din doza aplicată). Absorbția cutanată poate fi uneori exprimată doar cu ajutorul datelor fluidului receptor. Totuși, atunci când substanța de testare rămâne în piele la sfârșitul studiului, poate fi necesară includerea acestora în cantitatea totală absorbită (a se vedea alineatul 66 din referința 3). Atunci când are loc expunerea la doze nelimitate, datele pot permite calcularea unei constante de permeabilitate ( $K_p$ ). În aceste condiții, procentul absorbit este irelevant.

3.

**RAPORT**

3.1.

**RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă cerințele stipulate în protocol, inclusiv justificarea sistemului de testare utilizat, și trebuie să cuprindă următoarele:

Substanța de testare:

— stare fizică, proprietăți fizico-chimice (cel puțin greutatea moleculară și coeficientul de partiție octanol/apă –  $\log P_{ow}$ ), puritate (puritatea radiochimică);

— date de identificare (de exemplu numărul de lot);

— solubilitatea în fluidul receptor.

Preparatul de testare:

— formula și justificarea utilizării;

— omogenitatea.

Condiții de testare:

— sursele și locul pielii, metoda de preparare, condițiile de stocare înainte de folosire, orice tratări preliminare (curățare, tratare cu antibiotice etc.), măsurători de integritate a pielii, statutul metabolic, justificarea utilizării;

— modelul celulei, compoziția fluidului receptor, viteza de scurgere a fluidului receptor sau intervalele și procedeele de prelevare;

— detalii privind aplicarea preparatului de testare și cuantificare a dozei aplicate;

— durata de expunere;

— detalii privind înlăturarea preparatului de testare de pe piele, de exemplu curățarea prin spălare a pielii;

— detalii privind analiza pielii și tehnicile de fracționare utilizate pentru a demonstra distribuția în piele;

**▼B**

- procedurile de spălare a celulei și a aparatului;
- metodele de analiză, tehnicile de extracție, limitele de detectare și validarea metodei analitice.

Rezultate:

- recuperările totale ale experimentului (doza aplicată  $\equiv$  spălări ale pielii + piele + fluid receptor + spălări ale celulei);
- întocmirea unui tabel cu recuperările fiecărei celule în fiecare compartiment;
- profilul absorbției;
- întocmirea unui tabel cu datele absorbției (exprimate ca rată, cantitate sau procent).

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

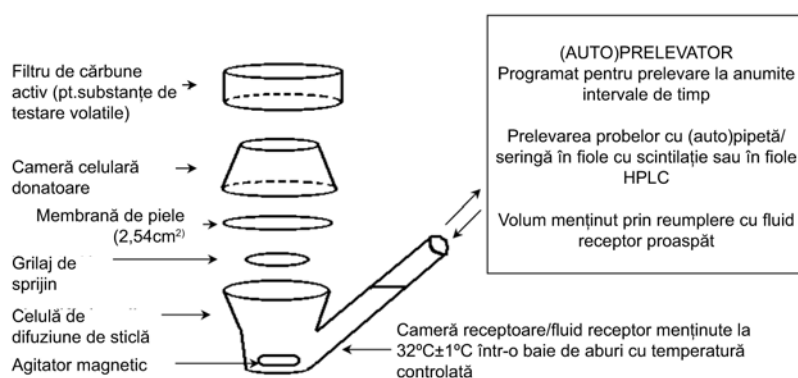
1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.
2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Anexa 1 la ENV/JM/TG(2 000)5. OECD, Paris.
4. Kempainen B. W. and Reifnath W. G. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
5. Bronaugh R.L. and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pag. 237-241.
6. Bronaugh R. L. and Maibach H. I. (1991). *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.
7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monografia No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
8. Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F., Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., Paye M., Spengler J., Steiling W. (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, Nr. 65.
10. Howes D., Guy R., Hadgraft J., Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼ B

11. Schaefer H. and Redelmeier T. E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
12. Roberts M. S. and Walters K. A. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
13. Jewell, C., Heylings, J. R., Clowes, H. M. And Williams, F. M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Exemplu de model tipic al celulei de difuzie statică pentru studiile *in vitro* a absorbției percutanate



## ▼ M3

**B.46. IRITAȚIA CUTANATĂ *IN VITRO*: TEST PE MODEL DE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ**

## INTRODUCERE

1. Iritația cutanată se referă la producerea unor leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de test timp de până la 4 ore [în conformitate cu definiția din Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Națiunilor Unite și Regulamentului (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (1)(3)]. Această metodă de testare (MT) asigură o procedură *in vitro* care poate fi folosită pentru identificarea riscurilor asociate substanțelor chimice iritante (substanțe și amestecuri) în conformitate cu GHS al ONU și categoria 2 prevăzută în Regulamentul CLP al UE (1) (2) (3). În UE și alte regiuni care nu au adoptat categoria 3 opțională (iritanți slabi) prevăzută în GHS al ONU, prezenta MT poate fi utilizată, de asemenea, pentru identificarea substanțelor chimice neclasificate, și anume cele din categoria „nicio categorie” din GHS al ONU și Regulamentul CLP al UE (1) (3). MT poate fi utilizată pentru a determina riscul substanțelor de a produce iritații cutanate ca test substitutiv de sine stătător pentru testul iritației cutanate *in vivo* în cadrul unei strategii de testare pe mai multe niveluri (4 și capitolul B.4 din prezenta anexă).
2. Până în prezent, evaluarea iritației cutanate a implicat în general utilizarea de animale de laborator [orientarea OCDE privind testarea nr. 404; capitolul B.4 din prezenta anexă] (4). În ceea ce privește preocupările legate de bunăstarea animalelor, capitolul B.4 a fost revizuit în 2004, permițând astfel determinarea coroziei/iritației cutanate prin aplicarea unei strategii de testare pe niveluri și prin folosirea unor metode *in vitro* și *ex vivo* validate, evitându-se astfel provocarea de durere și suferință animalelor. Trei metode de testare *in vitro* au fost adoptate ca orientări OCDE privind testările nr. 430, 431 și 435 (5) (6) (7) (două dintre acestea constituind capitolele B.40 și B.40bis ale prezentei anexe) urmând a fi folosite pentru partea de corozivitate din cadrul strategiei de testare pe niveluri prevăzută de B.4 sau de orientarea OCDE privind testarea nr. 404 (4).
3. Prezenta MT abordează pericolul iritației cutanate asupra sănătății umane. Aceasta se bazează pe epidermă umană reconstruită (RhE) care, prin concepția sa globală (utilizarea de keratinocite ne-transformate de proveniență umană ca celule-sursă și utilizarea de țesuturi și de arhitecturi celulare reprezentative), reproduce îndeaproape proprietățile biochimice și fiziologice ale stratului superior al pielii umane, și anume epiderma. MT include, de asemenea, un set de standarde de performanță (SP) (apendicele 2) pentru evaluarea metodelor similare și modificate de testare bazate pe epidermă umană reconstruită dezvoltate de Consiliul European pentru validarea metodelor alternative (EC-ECVAM) (8), în conformitate cu principiile stabilite în Documentul de orientare nr. 34 al OCDE (9).
4. Există trei metode validate conforme cu prezenta MT. Au fost finalizate studiile de validare prealabilă, de optimizare și de validare pentru o metodă *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), utilizând un model RhE, disponibil sub denumirea comercială de EpiSkin™ (și desemnată drept metoda de referință validată – MRV). Alte două metode *in vitro* pentru testarea iritației cutanate bazate pe RhE cu rezultate similare celor obținute prin MRV, conform unei validări bazate pe standarde de performanță (21), sunt disponibile sub formă comercială, și anume metodele RhE EpiDerm™ SIT (EPI-200) și SkinEthic™ (22).

## ▼ M3

5. Înainte ca o metodă RhE *in vitro* similară sau modificată propusă pentru iritația cutanată, alta decât MRV, EpiDerm™ SIT (EPI-200) sau SkinEthic™, să poată fi utilizată în scopul reglementării, trebuie stabilite fiabilitatea, relevanța (acuratețea) și limitele de utilizare ale acesteia în scopul propus, în vederea asigurării comparabilității cu MRV, în conformitate cu cerințele standardelor de performanță stabilite în cadrul prezentei MT (apendicele 2). În plus, se recomandă consultarea documentului de referință explicativ al OCDE privind testarea *in vitro* a iritației cutanate înainte de a dezvolta și de a valida o metodă RhE *in vitro* similară sau modificată și de a o înainta spre adoptare autorităților de reglementare (23).

## DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt prevăzute în apendicele 1.

## CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE

7. Una dintre limitele acestei MT, astfel cum a fost demonstrată de studiul de validare (16), este aceea că nu permite clasificarea substanțelor chimice în categoria 3 opțională (iritanți ușori) din GHS al ONU (1). În cazul în care este utilizată ca test de substituție parțială, ar putea fi necesare teste *in vivo* de monitorizare pentru a caracteriza complet potențialul de iritație cutanată (4 și capitolul B.4 din prezenta anexă). Este recunoscut faptul că utilizarea de piele umană face obiectul considerațiilor etice și al condițiilor stabilite la nivel național și internațional.
8. Această MT abordează componenta de iritație dermică *in vitro* a strategiei de testare pe mai multe niveluri propusă în cadrul B.4 (orientarea OCDE privind testarea nr. 404) cu privire la corозиunea/iritația cutanată (4). În timp ce MT nu furnizează informații adecvate privind corозиunea cutanată, trebuie remarcat faptul că capitolul B.40bis (orientarea OCDE privind testarea nr. 431) privind corозиunea cutanată se bazează pe același sistem de testare pe RhE chiar dacă utilizează un alt protocol (capitolul B.40 bis). Prezenta metodă se bazează pe modelele de RhE care utilizează keratinocite umane, ce reproduc prin urmare *in vitro* organul țintă al speciei studiate. În plus, aceasta acoperă direct etapa inițială a cascadei inflamatorii sau a mecanismului de acțiune (leziuni celulare și ale țesuturilor cauzând un traumatism localizat) care are loc în timpul iritației *in vivo*. În cadrul procesului de validare a acestei MT a fost testată o gamă largă de substanțe chimice, iar baza de date empirice a studiului de validare s-a ridicat la un total de 58 de substanțe chimice (16) (18) (23). MT este aplicabilă substanțelor solide, lichide, semisolidе și cerii. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul unui studiu de validare (24). Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhE, actuala MT nu permite testarea produselor de acest tip. Trebuie remarcat, de asemenea, că substanțele chimice cu un grad înalt de colorare ar putea interfera cu măsurătorile viabilității celulare și că ele ar putea necesita utilizarea de controale adaptate pentru corecturi (a se vedea punctele 24-26).
9. O singură serie de testare compusă din trei replici de țesuturi ar trebui să fie suficientă pentru o substanță chimică de test dacă clasificarea este fără echivoc. În schimb, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători discordante ale replicilor și/sau un procent mediu al viabilității egal cu  $50 \pm 5\%$ , trebuie avută în vedere o a doua serie, precum și o a treia serie în cazul unor rezultate discordante între primele două serii.

## ▼ M3

## PRINCIPIUL TESTULUI

10. Substanța chimică testată se aplică local pe un model tridimensional de RhE compus din keratinocite ne-transformate derivate din epidermă umană care au fost cultivate pentru a forma un model multistratificat extrem de diferențiat de epidermă umană. Modelul este compus din straturi organizate (bazal, spinos și granular), precum și dintr-un strat cornos (*stratum corneum*) multistratificat care conține straturi lipidice lamelare intercelulare reprezentând principalele clase lipidice similare celor observate *in vivo*.
11. Irritația cutanată indusă de substanțe chimice, manifestată prin eritem și edem, este rezultatul unei cascade de evenimente începând cu penetrarea stratului cornos și lezarea straturilor inferioare de keratinocite. Keratinocitele care mor eliberează agenți de mediere care stau la originea cascadei inflamatorii care acționează asupra celulelor dermei, în special celulele stromale și endoteliale. Dilatarea și permeabilitatea crescută a celulelor endoteliale sunt cele care produc eritemele și edemele observate (24). Metodele bazate pe RhE măsoară evenimentele declanșatoare ale cascadei.
12. Viabilitatea celulară a modelelor de RhE se măsoară prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil; nr. CAS 298-93-1] într-o sare de formazan de culoare albastră care poate fi măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (25). Substanțele chimice iritante sunt identificate pe baza capacității acestora de a reduce viabilitatea celulară sub pragurile stabilite (și anume  $\leq 50\%$  pentru substanțele din categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE). În funcție de cadrul de reglementare în care sunt utilizate rezultatele obținute în urma aplicării acestei MT, substanțele chimice pentru care viabilitatea celulară este superioară nivelului stabilit pot fi considerate non-iritante (și anume  $> 50\%$ , nicio categorie).

## DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

13. Înainte de utilizarea sistematică a oricăreia dintre cele trei metode validate conforme cu prezenta MT, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele lor tehnice, utilizând cele 10 substanțe de referință enumerate în tabelul 1. Pentru metodele similare dezvoltate în cadrul acestei MT sau pentru modificările aduse oricăreia dintre cele trei metode validate, cerințele prevăzute în standardele de performanță descrise în apendicele 2 din prezenta MT trebuie să fie îndeplinite înainte ca metoda să fie utilizată pentru testare în scopul reglementării.
14. Ca parte a demonstrării performanței, se recomandă ca utilizatorul să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire astfel cum sunt specificate de producătorul modelului de RhE. Această etapă este în mod special importantă în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade de timp lungi. Odată ce o metodă a fost stabilită cu succes, iar performanța acesteia în utilizare a fost demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, dacă o metodă se utilizează sistematic, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

Tabelul 1

Substanțe chimice de referință <sup>(1)</sup>

| Substanța chimică | Nr. CAS | Scorul <i>in vivo</i> <sup>(2)</sup> | Starea fizică | Categoria din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE |
|-------------------|---------|--------------------------------------|---------------|---|
| Acid naftilacetic | 86-87-3 | 0                                    | Solid         | Nicio categorie                                 |
| Izopropanol       | 67-63-0 | 0,3                                  | Lichid        | Nicio categorie                                 |

## ▼ M3

| Substanța chimică             | Nr. CAS   | Scorul <i>in vivo</i> <sup>(2)</sup> | Starea fizică | Categoria din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE                       |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------|---|
| Stearat de metil              | 112-61-8  | 1                                    | Solid         | Nicio categorie   |
| Butirat de heptil             | 5870-93-9 | 1,7                                  | Lichid        | Nicio categorie<br>(Cat. 3 opțională) <sup>(3)</sup> , <sup>(4)</sup> |
| Salicilat de hexil            | 6259-76-3 | 2                                    | Lichid        | Nicio categorie<br>(Cat. 3 opțională) <sup>(3)</sup> , <sup>(4)</sup> |
| Ciclamenaldehidă              | 103-95-7  | 2,3                                  | Lichid        | Categoria 2   |
| 1-bromhexan                   | 111-25-1  | 2,7                                  | Lichid        | Categoria 2   |
| Hidroxid de potasiu (5 % apă) | 1310-58-3 | 3                                    | Lichid        | Categoria 2   |
| 1-metil-3-fenil-1-piperazină  | 5271-27-2 | 3,3                                  | Solid         | Categoria 2   |
| Heptanal                      | 111-71-7  | 3,4                                  | Lichid        | Categoria 2   |

<sup>(1)</sup> Aceste substanțe chimice de referință constituie un subsansamblu al substanțelor chimice de referință utilizate în studiul de validare.

<sup>(2)</sup> Scorul *in vivo* în conformitate cu B.4 și orientarea OCDE privind testarea nr. 404 (4).

<sup>(3)</sup> În cadrul prezentei MT, categoria 3 opțională (iritanți ușori) din GHS al Națiunilor Unite (1) este considerată „nicio categorie”.

<sup>(4)</sup> Categoria 3 opțională din GHS al Națiunilor Unite nu se aplică în cadrul Regulamentului CLP al UE.

## PROCEDURĂ

15. În cele ce urmează se descriu elementele și procedurile unei metode bazate pe RhE pentru evaluarea iritației cutanate. Trebuie reconstruit un model de RhE; acesta poate fi preparat în laborator sau poate fi obținut din comerț. Procedurile standard de operare (PSO) pentru EpiSkin<sup>TM</sup>, EpiDerm<sup>TM</sup> SIT (EPI-200) și SkinEthic<sup>TM</sup> RHE sunt disponibile (26) (27) (28). Testarea trebuie efectuată în conformitate cu următoarele aspecte:

## Elementele metodei de testare bazate pe epidermă umană reconstituită

## Condiții generale

16. Pentru reconstrucția epiteliului trebuie utilizate keratinocite ne-transformate umane. Sub stratul cornos funcțional trebuie să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile (stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos). Stratul cornos trebuie să fie multistratificat și să prezinte profilul lipidic esențial pentru a constitui o barieră funcțională robustă care să reziste la penetrarea rapidă a substanțelor marker citotoxice, de exemplu dodecilsulfat de sodiu (SDS) sau Triton X-100. Barierea funcțională trebuie demonstrată și poate fi evaluată fie prin stabilirea concentrației la care substanța marker reduce viabilitatea celulară cu 50 % (IC<sub>50</sub>) după o perioadă fixă de expunere, fie prin stabilirea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % (ET<sub>50</sub>) la aplicarea substanței marker cu o concentrație specifică fixă. Etanșeitatea modelului RhE trebuie să prevină trecerea substanței dincolo de stratul cornos către țesutul viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelizare a expunerii pielii. Modelul de RhE nu trebuie să fie contaminat cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.



▼ **M3***Condiții funcționale*

## Viabilitate

17. Amplitudinea viabilității se măsoară cu ajutorul colorantului MTT (25). Utilizatorii modelului de RhE trebuie să se asigure că fiecare lot de model de RhE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă (NC). Densitatea optică (DO) a solventului de extracție trebuie să fie suficient de mică, și anume  $DO < 0,1$ . Producătorul/furnizorul modelului RhE trebuie să stabilească o plajă de valori acceptabile (limita superioară și cea inferioară) pentru DO a substanței martor negative (în condițiile metodei de testare a iritației cutanate). Plajele de valori acceptabile pentru cele trei metode validate sunt prezentate în tabelul 2. Trebuie documentat faptul că țesutul tratat cu substanță martor negativă este stabil în cultură (prezintă măsurători similare ale viabilității) pe durata perioadei de expunere.

Tabelul 2

**Plaja de valori acceptabile pentru DO a substanței martor negative**

|                                     | Limita inferioară de acceptabilitate | Limita superioară de acceptabilitate |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EpiSkin <sup>TM</sup> (SM)          | $\geq 0,6$                           | $\leq 1,5$                           |
| EpiDerm <sup>TM</sup> SIT (EPI-200) | $\geq 1,0$                           | $\leq 2,5$                           |
| SkinEthic <sup>TM</sup> RHE         | $\geq 1,2$                           | $\leq 2,5$                           |

## Funcția de barieră

18. Stratul cornos și compoziția lipidică a acestuia trebuie să fie suficiente pentru a rezista la penetrarea rapidă a substanțelor marker citotoxice, de exemplu SDS sau Triton X-100, estimată prin  $IC_{50}$  sau  $ET_{50}$  (tabelul 3).

## Morfologie

19. Examinarea histologică a modelului de RhE trebuie să se efectueze prin demonstrarea unei structuri similare celei a epidermei umane (inclusiv stratul cornos multistratificat).

## Reproductibilitatea

20. Rezultatele substanței chimice martor pozitive (PC) și a substanțelor martor negative (NC) ale metodei de testare trebuie să demonstreze reproductibilitatea în timp.

## Controlul de calitate (CC)

21. Producătorul/furnizorul modelului de RhE trebuie să se asigure și să demonstreze că fiecare lot de modele de RhE îndeplinește criterii de fabricare bine definite, printre care cele mai importante sunt criteriile privind *viabilitatea* (punctul 17), *funcția de barieră* (punctul 18) și *morfologia* (punctul 19). Datele respective trebuie furnizate utilizatorilor metodei pentru ca aceștia să le poată include în raportul de testare. Producătorul/furnizorul de modele de RhE (sau investigatorul, atunci când se utilizează un model produs intern) trebuie să stabilească o plajă de valori acceptabile (limita superioară și cea inferioară) pentru  $IC_{50}$  sau  $ET_{50}$ . Numai rezultatele obținute pe baza unor țesuturi corespunzătoare pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a clasificării iritației. În continuare sunt prezentate în tabelul 3, cu titlu de exemplu, plajele de valori acceptabile pentru cele trei metode de referință validate:

## ▼ M3

Tabelul 3

## Exemple de criterii de control al calității loturilor

|  | Limita superioară de acceptabilitate | Limita inferioară de acceptabilitate |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EpiSkin™ (SM)<br>(18 ore de tratament cu SDS) (26) | IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml         | IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml         |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200)<br>(1 % Triton X-100) (27)  | ET <sub>50</sub> = 4,8 hr            | ET <sub>50</sub> = 8,7 hr            |
| SkinEthic™ RHE<br>(1 % Triton X-100) (28)          | ET <sub>50</sub> = 4,0 hr            | ET <sub>50</sub> = 9,0 hr            |

## Aplicarea substanțelor chimice de test și a substanțelor chimice de control

22. Trebuie utilizate cel puțin trei replici pentru fiecare substanță chimică de test și pentru substanțele martor din fiecare serie. Atât în cazul substanțelor lichide, cât și în cazul celor solide, trebuie aplicată o cantitate suficientă de substanță de test pentru a acoperi uniform suprafața epidermei, evitându-se în același timp o doză infinită, și anume trebuie utilizat minimum 25  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  sau 25  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . În cazul substanțelor solide, suprafața epidermei trebuie umezită cu apă deionizată sau distilată înainte de aplicare, pentru a îmbunătăți contactul dintre substanța de test și suprafața epidermei. În măsura în care este posibil, solidele trebuie testate sub formă de pulbere fină. La sfârșitul perioadei de expunere, substanța testată trebuie spălată cu atenție de pe suprafața epidermei, utilizând o soluție-tampon apoasă sau NaCl de 0,9 %. În funcție de care dintre cele trei metode validate bazate pe RhE este utilizată, perioada de expunere variază între 15 și 60 de minute, iar temperatura de incubare variază între 20 °C și 37 °C. Aceste perioade și temperaturi de expunere sunt optimizate pentru fiecare metodă bazată pe RhE și țin cont de proprietățile intrinseci diferite pentru fiecare metodă. Pentru detalii, a se consulta Procedurile standard de operare (PSO) pentru cele trei metode (26) (27) (28).

23. Pentru fiecare serie trebuie utilizate substanțe martor negative (NC) și pozitive (PC) concomitente cu scopul de a demonstra că viabilitatea (în cazul NC), funcția de barieră și sensibilitatea rezultată (în cazul PC) a țesuturilor se încadrează în plaja istorică definită de valori acceptabile. Substanța PC recomandată este soluția apoasă de SDS de 5 %. Substanțele NC recomandate sunt apa sau o soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

## Măsurători ale viabilității celulare

24. Cel mai important element al procedurii de testare este faptul că măsurătorile de viabilitate celulară nu se efectuează imediat după expunerea la substanțele de test, ci după o perioadă de incubare posttratament suficient de lungă a țesuturilor spălate în mediu proaspăt. Această perioadă permite atât recuperarea în urma unor efecte citotoxice ușoare, cât și manifestarea efectelor citotoxice clare. Faza de optimizare (11) (12) (13) (14) (15) a demonstrat că o perioadă de incubare posttratament de 42 de ore este optimă.

25. Testul cu MTT este o metodă cantitativă validată recomandată pentru măsurarea viabilității celulare în cadrul prezentei MT. Acesta este compatibil cu utilizarea unei arhitecturi tridimensionale a țesutului. Mostra de țesut este introdusă într-o soluție de MTT cu o concentrație adecvată (de exemplu, 0,3-1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) timp de 3 ore. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras din țesut utilizând un solvent (de exemplu, izopropanol sau izopropanol acid) și concentrația de formazan se măsoară determinând densitatea optică la 570 nm prin folosirea unei benzi de trecere filtrantă de maximum  $\pm 30$  nm.

## ▼ M3

26. Proprietățile optice ale substanței testate sau acțiunea sa chimică asupra MTT pot interfera cu testul, conducând la o falsă estimare a viabilității (deoarece substanța testată poate împiedica, poate inversa sau poate chiar produce generarea culorii). Acest lucru se poate întâmpla atunci când o anumită substanță testată nu este complet eliminată de pe piele prin spălare sau atunci când penetrează epiderma. Dacă substanța testată acționează direct asupra MTT (agent de reducere a MTT), dacă este colorată în mod natural sau dacă se colorează în timpul tratamentului țesutului, trebuie utilizate controale suplimentare pentru a detecta și corecta interferența substanței testate cu tehnica de măsurare a viabilității. O descriere detaliată a modului în care poate fi corectată direct reducerea MTT și interferențele cu ajutorul agenților de colorare este disponibilă în PSO pentru cele trei metode validate (26) (27) (28).

*Criterii de acceptabilitate*

27. Pentru fiecare metodă care utilizează loturi valabile de modele de RhE (a se vedea punctul 21), țesuturile tratate cu NC trebuie să prezinte o densitate optică care să reflecte calitatea țesuturilor supuse etapelor de transport și recepționare, precum și tuturor etapelor de protocol. Valorile densității optice (DO) a substanțelor martor nu trebuie să fie inferioare limitelor istorice stabilite. În mod analog, țesuturile tratate cu PC, și anume soluție apoasă de SDS la 5 %, trebuie să reflecte capacitatea acestora de răspuns la o substanță chimică iritantă în condițiile metodelor de testare (26) (27) (28). Trebuie definite valori asociate și adecvate ale variabilității între replicile de țesut [de exemplu, dacă sunt utilizate deviațiile standard (DS), acestea trebuie să se încadreze în intervalul de toleranță unilateral 95 % calculat pe baza datelor istorice; pentru DS MRV < 18 %].

*Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv*

28. Valorile densității optice pentru fiecare substanță de test pot fi utilizate pentru a calcula procentul de viabilitate în raport cu NC, care este stabilit la 100 %. Valoarea limită a procentului de viabilitate celulară pe baza căreia se face distincția între substanțele testate iritante și cele neclasificate, precum și procedura (procedurile) statistică (statistice) utilizate pentru evaluarea rezultatelor și identificarea substanțelor iritante trebuie clar definite și documentate; de asemenea, trebuie demonstrat faptul că acestea sunt adecvate. În continuare sunt prezentate valorile limită pentru estimarea efectelor iritante:

- substanța testată este considerată iritantă pentru piele în conformitate cu categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE dacă viabilitatea țesutului după expunere și perioada de incubare posttratament este mai mică sau egală ( $\leq$ ) cu 50 %;
- în funcție de cadrul de reglementare în care sunt utilizate rezultatele obținute în urma aplicării prezentei MT, substanța testată poate fi considerată non-iritantă pentru piele în conformitate cu „nicio categorie” din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE dacă viabilitatea țesutului după expunere și perioada de incubare posttratament este mai mare ( $>$ ) de 50 %.

## DATE ȘI RAPORTAREA

*Date*

29. Pentru fiecare serie, trebuie raportate sub forma unui tabel date obținute pentru fiecare replică de țesut (de exemplu, valorile densității optice și datele procentuale privind viabilitatea celulară pentru fiecare substanță testată, inclusiv clasificarea corespunzătoare), inclusiv rezultatele obținute în urma repetării experimentelor, dacă este cazul. În plus, trebuie raportate, pentru fiecare serie, valorile medii  $\pm$  DS. Interacțiunile observate cu reactivul MTT și cu substanțele testate colorate trebuie raportate pentru fiecare substanță testată.

**▼ M3***Raportul de testare*

30. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțe testate și de control:

- denumire (denumiri) chimică (chimice), cum ar fi denumirea și numărul CAS, denumirea și numărul CE, dacă se cunosc;
- puritatea și compoziția substanței [în procent(e) de greutate];
- proprietățile fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului (de exemplu, starea fizică, stabilitatea și volatilitatea, pH-ul, solubilitatea în apă, dacă se cunosc);
- tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);
- condiții de depozitare.

Justificare privind modelul de RhE și protocolul utilizat.

Condiții de testare:

- sistemul celular utilizat;
- informații complete privind modelul de RhE utilizat, inclusiv performanța acestuia. Aceasta trebuie să includă (listă neexhaustivă):
  - i) viabilitatea;
  - ii) funcția de barieră;
  - iii) morfologia;
  - iv) reproductibilitatea și predictibilitatea;
  - v) controalele de calitate (CC) a modelului;
- detalii cu privire la procedura de testare utilizată;
- dozele de testare utilizate, durata expunerii și perioada de incubare post-tratament;
- descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;
- trimiteri la datele istorice ale modelului. Aceasta trebuie să includă (listă neexhaustivă):
  - i) acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul;
  - ii) acceptabilitatea valorilor martorilor pozitivi și negativi în comparație cu valorile medii și plajele de valori ale martorilor pozitivi și negativi;
- descrierea criteriilor de evaluare folosite, inclusiv justificarea privind alegerea alineatului (punctelor) limită pentru modelul predictiv;
- trimiteri la datele istorice ale martorilor.

## ▼ M3

## Rezultate:

- prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute în cazul substanțelor chimice individuale testate pentru fiecare serie și fiecare măsurătoare a unei replici;
- indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare;
- descrierea altor efecte observate.

## Discutarea rezultatelor

## Concluzie

## BIBLIOGRAFIE

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Disponibil la: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev03/03files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html)]
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) 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. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765-770.

## ▼ M3

- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and 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.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and 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.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (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, 329-349.
- (15) 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. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gerner, I., 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.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- $\alpha$ . Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tesson-neaud, E. and Leclaire, J. (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, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Disponibil la: [[http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_47858904\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html)]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicol. in Vitro* 18, 231-243.

▼ **M3**

- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: *Practical Contact Dermatitis*, pp. 7-18, (Ed. Guin J. D.). McGraw-Hill, New York.
- (30) Directiva 2001/59/CE a Comisiei din 6 august 2001 de efectuare a celei de-a douăzeci și opta adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase, JO L 225, 21.8.2001, p. 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *ALTEX*, 14, 359-365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

## ▼ M3

## Apendicele 1

## Definiții

**Acuratețe:** Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (9).

**Viabilitate celulară:** Parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare, de exemplu capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT [bromură de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilte-trazoliu, albastru de tiazoliu], care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

**Concordanță:** Este un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „acuratețe” și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. (9).

**ET<sub>50</sub>:** Poate fi estimat prin calcularea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % odată cu aplicarea substanței marker cu o concentrație specifică fixă (a se vedea, de asemenea, IC<sub>50</sub>).

**Regulamentul CLP al UE [Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și amestecurilor]:** Pune în aplicare în Uniunea Europeană (UE) sistemul global armonizat (GHS) al Națiunilor Unite pentru clasificarea și etichetarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) (3).

**GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite (ONU)]:** Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de riscuri fizice, riscuri pentru sănătate și riscuri pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, fraze de pericol, fraze de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv angajatori, lucrători, transportatori, consumatori și servicii de urgență) și a mediului (1).

**IC<sub>50</sub>:** Poate fi estimat prin determinarea concentrației la care o substanță marker reduce viabilitatea țesutului cu 50 % (IC<sub>50</sub>) după o perioadă fixă de expunere (a se vedea, de asemenea, ET<sub>50</sub>).

**Doză infinită:** Cantitate de substanță chimică testată aplicată pe epidermă care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epidermei.

**Test „me-too”:** O expresie colocvială utilizată pentru o metodă de testare care, din punct de vedere structural și funcțional, este similară cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. O astfel de metodă de testare ar putea face obiectul unei validări accelerate. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară (9).

**Standarde de performanță (SP):** Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) nivelurile comparabile de acuratețe și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care trebuie obținute de metoda de testare propusă în momentul evaluării sale pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (9).



▼ **M3**

*Substanțe chimice de referință:* Substanțe chimice selectate pentru utilizare în procesul de validare, pentru care răspunsurile la sistemul de testare de referință *in vitro* sau *in vivo* sau speciile studiate sunt deja cunoscute. Aceste substanțe trebuie să fie reprezentative pentru clasele de substanțe chimice pentru care se preconizează utilizarea metodei de testare și trebuie să reprezinte toată gama de răspunsuri care pot fi preconizate ca provenind de la substanțele pentru care ar putea fi folosită, de la puternic, la slab, la negativ. Ar putea fi necesare diferite seturi de substanțe chimice de referință pentru diferitele etape ale procesului de validare și pentru diferitele metode de testare și utilizări ale testării (9).

*Relevanță:* Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include acuratețea (concordanța) unei metode de testare (9).

*Fiabilitate:* Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (9).

*Test substitutiv:* Un test conceput să substituie un test utilizat în mod sistematic și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost conceput pentru a furniza o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat pentru toate situațiile de testare posibile și toate substanțele chimice (9).

*Sensibilitate:* Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active testate clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateții unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea fiabilității unei metode de testare (9).

*Iritație cutanată:* Producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice testate timp de până la 4 ore. Iritația cutanată este o reacție locală, neimunogenă, care apare la scurt timp după stimulare (29). Principala sa caracteristică este natura reversibilă care implică reacții inflamatorii și majoritatea semnelor clinice caracteristice iritației (eritem, edem, prurit și durere) asociate unui proces inflamator.

*Specificitate:* Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive testate clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateții unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea fiabilității unei metode de testare (9).

*Strategie de testare pe niveluri:* Testare care utilizează metode de testare în mod secvențial; metodele de testare selectate pentru fiecare nivel următor sunt decise pe baza rezultatelor obținute în nivelul de testare anterior (9).

*Substanță chimică de test (denumită, de asemenea, substanță de test):* Orice substanță sau amestec care este testată cu ajutorul prezentei metode de testare.

## ▼ M3

## Apendicele 2

**Standarde de performanță pentru evaluarea metodelor similare sau modificate propuse pentru testele de iritație cutanată *in vitro* bazate pe epidermă umană reconstruită (RhE)**

## INTRODUCERE

1. Scopul standardelor de performanță (SP) este de a indica temeiul de evaluare a acurateții și fiabilității noilor metode de testare, protejate sau nu (de exemplu, cu drept de autor, marcă depusă sau înregistrare) în raport cu obiectivele definite. Standardele de performanță bazate pe metode de testare validate și acceptate pot fi utilizate pentru a evalua fiabilitatea și acuratețea altor metode similare (cunoscute în limbaj curent sub denumirea de teste „me-too”) bazate pe principii științifice similare și care măsoară sau estimează același efect biologic sau toxic (9).
2. Înainte de a adopta o serie de metode modificate (și anume, potențiale îmbunătățiri propuse pentru o metodă de testare aprobată), trebuie efectuată o evaluare în vederea stabilirii efectului modificărilor propuse asupra performanței testului și măsura în care astfel de modificări afectează informațiile disponibile pentru celelalte elemente componente ale procesului de validare. În funcție de numărul și de natura modificărilor propuse, datele generate și documentația corespunzătoare pentru modificările respective, procesul de validare este același ca și în cazul unui nou test sau, dacă este cazul, acesta este limitat la o evaluare a fiabilității și a relevanței pe baza SP stabilite (9).
3. Fiabilitatea și acuratețea metodelor similare („me-too”) sau modificate pentru oricare dintre cele trei metode validate [EpiSkin™ (metodă de referință validată – MRV), EpiDerm™ SIT (EPI-200) și SkinEthic™ RHE] propuse pentru utilizare în cadrul prezentei MT trebuie evaluate folosind substanțe chimice reprezentând întreaga gamă de scoruri Draize de evaluare a efectelor iritante. Atunci când sunt evaluate folosind cele 20 de substanțe chimice de referință ale SP (tabelul 1), metodele similare sau modificate propuse trebuie să prezinte valori ale fiabilității și acurateții comparabile sau mai bune decât cele ale MRV (tabelul 2) (2) (16). Valorile de fiabilitate și de acuratețe care trebuie atinse sunt prezentate la punctele 8-12 din prezentul apendice. Sunt incluse substanțele chimice neclasificate („nicio categorie” din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE) și cele clasificate (categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE) (1), reprezentând diferite clase chimice, astfel încât fiabilitatea și performanța (sensibilitatea, specificitatea și acuratețea globală) metodei propuse să poată fi comparate cu cele ale MRV. Fiabilitatea metodei, precum și capacitatea acesteia de a identifica în mod corect substanțele chimice iritante din categoria 2 din GHS al ONU și, în funcție de cadrul de reglementare pentru care sunt produse datele, de asemenea, capacitatea acesteia de a identifica în mod corect substanțele chimice din categoria „nicio categorie” din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE (trebuie determinate înainte ca aceasta să fie utilizată pentru testarea unor substanțe chimice noi).
4. Prezentele SP se bazează pe standardele de performanță ale Comitetului European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) al Comisiei Europene (8), actualizate în conformitate cu sistemele GHS al ONU și cu cele prevăzute de Regulamentul CLP al UE privind clasificarea și etichetarea (1) (3). Standardele de performanță inițiale au fost definite ulterior finalizării studiului de validare (21) și s-au bazat pe sistemul de clasificare UE prevăzut în Directiva 2001/59/CE a Comisiei din 6 august 2001 de efectuare a celei de-a douăzeci și opta adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (<sup>(1)</sup>). Standardele de performanță au fost

(<sup>1</sup>) JO L 225, 21.8.2001, p. 1.

▼ **M3**

actualizate (8) ca urmare a adoptării sistemului GHS al ONU pentru clasificare și etichetare în UE (Regulamentul CLP al UE) (3), care a avut loc între finalizarea studiului de validare și finalizarea prezentei MT. Prezenta actualizare vizează în principal modificări (i) ale setului de substanțe chimice de referință ale SP; și (ii) ale valorilor de fiabilitate și acuratețe stabilite (2) (23).

#### STANDARDE DE PERFORMANȚĂ PENTRU METODELE DE TESTARE A IRITAȚIEI CUTANATE *IN VITRO* BAZATE PE RhE

##### 5. SP cuprind următoarele trei elemente (9):

(I) componentele esențiale ale metodei de testare;

(II) lista minimală a substanțelor chimice de referință;

(III) valorile stabilite de fiabilitate și acuratețe.

##### (I) Componentele esențiale ale metodei de testare

6. Componentele esențiale constau din elementele structurale, funcționale și procedurale esențiale ale unei metode validate, care trebuie incluse în protocolul oricărei metode similare din punct de vedere funcțional și structural, sau ale unei metode modificate propuse. Acestea includ caracteristicile unice ale metodei, detaliile procedurale esențiale și măsurile de control al calității. Conformitatea cu componentele esențiale ale metodei de testare va contribui la asigurarea faptului că o metodă similară sau modificată propusă se bazează pe aceleași concepte ca și MRV corespondentă (9). Componentele esențiale ale metodei de testare sunt descrise în detaliu la punctele 16-21 din MT, iar testarea trebuie să se efectueze în conformitate cu următoarele elemente:

— condițiile generale (punctul 16);

— condițiile funcționale, care includ:

— viabilitatea (punctul 17);

— funcția de barieră (punctul 18);

— morfologia (punctul 19);

— reproductibilitatea (punctul 20); și

— controlul calității (punctul 21).

##### (II) Lista minimală a substanțelor chimice de referință

7. Substanțele chimice de referință sunt utilizate pentru a determina dacă fiabilitatea și acuratețea unei metode similare sau modificate propuse, dovedite a fi din punct de vedere structural și funcțional suficient de similară cu MRV sau reprezentând o modificare minoră a uneia dintre cele trei metode validate, sunt comparabile cu sau mai bune decât cele ale MRV (2) (8) (16) (23). Cele 20 de substanțe chimice de referință recomandate indicate în tabelul 1 includ substanțe chimice reprezentând diferite clase de substanțe chimice (și anume, categorii de substanțe chimice bazate pe grupuri funcționale) și sunt reprezentative pentru întreaga gamă de scoruri Draize de evaluare a efectelor iritante (de la non-iritante la puternic iritante). Substanțele chimice incluse în această listă cuprind 10 substanțe chimice din categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE și 10 substanțe chimice neclasificate, din care 3 sunt substanțe chimice din categoria 3 opțională. În cadrul prezentei metode de testare, categoria 3 opțională este considerată „nicio categorie”. Substanțele chimice enumerate în tabelul 1 sunt selectate dintre substanțele chimice utilizate în etapa de optimizare care a urmat pre-validării și în studiul de validare a MRV cu privire la funcționalitatea chimică și starea fizică (14) (18). Aceste substanțe chimice de referință reprezintă numărul minim de substanțe care trebuie

## ▼M3

utilizate pentru a evalua fiabilitatea și acuratețea unei metode similare sau modificate propuse, dar nu trebuie utilizate pentru dezvoltarea de noi metode. În situația în care o substanță chimică indicată nu este disponibilă, pot fi utilizate alte substanțe chimice pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* adecvate, în special dintre cele utilizate în etapa de optimizare ulterior pre-validării sau studiului de validare a MRV. Dacă se dorește, în lista minimală de substanțe chimice de referință pot fi adăugate substanțe chimice suplimentare reprezentând alte clase de substanțe chimice și pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* adecvate, în vederea evaluării aprofundate a acurateții metodei propuse.

Tabelul 1

**Lista minimală a substanțelor chimice de referință pentru stabilirea valorilor de acuratețe și fiabilitate ale metodelor de evaluare a iritației cutanate bazate pe RhE, similare sau modificate<sup>(1)</sup>**

| Substanță chimică  | Număr CAS  | Stare fizică | Scorin <i>in vivo</i> | Categoria MRV <i>in vitro</i> | Categoria GHS al ONU/Reg. CLP al UE <i>in vivo</i> |
|--|------------|--------------|-----------------------|-------------------------------|--|
| 1-bromo-4-clorobutan                                       | 6940-78-9  | Lichid       | 0                     | Cat. 2                        | Nicio cat.   |
| Ftalat de dietil   | 84-66-2    | Lichid       | 0                     | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| Acid naftilacetic  | 86-87-3    | Solid        | 0                     | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| Fenoxiacetat de alil                                       | 7493-74-5  | Lichid       | 0,3                   | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| Izopropanol  | 67-63-0    | Lichid       | 0,3                   | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| 4-(metiltio)-benzaldehydă                                  | 3446-89-7  | Lichid       | 1                     | Cat. 2                        | Nicio cat.   |
| Stearat de metil   | 112-61-8   | Solid        | 1                     | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| Butirat de heptil  | 5870-93-9  | Lichid       | 1,7                   | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| Salicilat de hexil   | 6259-76-3  | Lichid       | 2                     | Nicio cat.                    | Nicio cat.   |
| cinamaldehydă  | 104-55-2   | Lichid       | 2                     | Cat. 2                        | Nicio cat.<br>(Cat. 3 opțională) <sup>(3)</sup>    |
| 1-decanol <sup>(2)</sup>                                   | 112-30-1   | Lichid       | 2,3                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| Ciclamenaldehydă   | 103-95-7   | Lichid       | 2,3                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| 1-bromhexan  | 111-25-1   | Lichid       | 2,7                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| Hidroclorură de 2-cloro-metil-3,5-dimetil-4-metoxipiridină | 86604-75-3 | Solid        | 2,7                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| Disulfură de di-n-propil <sup>(2)</sup>                    | 629-19-6   | Lichid       | 3                     | Nicio cat.                    | Cat. 2   |
| Hidroxid de potasiu (5 % apă)                              | 1310-58-3  | Lichid       | 3                     | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| Benzentiol, 5-(1,1-dimetil-letil)-2-metil                  | 7340-90-1  | Lichid       | 3,3                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| 1-metil-3-fenil-1-piperazină                               | 5271-27-2  | Solid        | 3,3                   | Cat. 2                        | Cat. 2   |

## ▼ M3

| Substanță chimică | Număr CAS | Stare fizică | Scorin vivo | Categoria MRV <i>in vitro</i> | Categoria GHS al ONU/Reg. CLP al UE <i>in vivo</i> |
|-------------------|-----------|--------------|-------------|-------------------------------|--|
| Heptanal          | 111-71-7  | Lichid       | 3,4         | Cat. 2                        | Cat. 2   |
| Tetracloretilenă  | 127-18-4  | Lichid       | 4           | Cat. 2                        | Cat. 2   |

(<sup>1</sup>) Selecția substanțelor chimice se bazează pe următoarele criterii: (i) substanțele chimice sunt disponibile pe piață; (ii) ele sunt reprezentative pentru întreaga gamă de scoruri Draize de evaluare a efectelor iritante (de la substanțe neiritante până la substanțe puternic iritante); (iii) au o structură chimică bine definită; (iv) sunt reprezentative pentru funcționalitatea chimică utilizată în procesul de validare; și (v) nu sunt asociate unui profil extrem de toxic (de exemplu, cancerigen sau toxic pentru sistemul de reproducere) și nu sunt asociate unor costuri de eliminare prohibitive.

(<sup>2</sup>) Substanțe chimice iritante la iepuri, dar pentru care există dovezi fiabile conform cărora acestea ar fi neiritante la oameni (31) (32) (33).

(<sup>3</sup>) În conformitate cu GHS al ONU, nu există în Regulamentul CLP al UE.

## (III) Valorile definite de acuratețe și fiabilitate

8. În scopul stabilirii fiabilității și relevanței metodelor similare sau modificate propuse pentru a fi transferate între laboratoare, toate cele 20 de substanțe chimice de referință din tabelul 1 trebuie testate în cel puțin trei laboratoare. Cu toate acestea, dacă metoda propusă urmează să fie utilizată în cadrul unui singur laborator, nu este necesară testarea în mai multe laboratoare pentru validare. Totuși, este esențial ca astfel de studii de validare să fie evaluate independent de către organisme de validare recunoscute la nivel internațional, în conformitate cu orientările internaționale (9). În fiecare laborator, toate cele 20 de substanțe chimice de referință trebuie testate în trei serii de teste independente efectuate cu loturi diferite de țesut și la intervale de timp suficiente. Fiecare serie trebuie să conste din minim trei replici de țesut testate concomitent pentru fiecare substanță chimică, substanță martor negativă și substanță martor pozitivă inclusă.

9. Calcularea valorilor de fiabilitate și de acuratețe ale metodei propuse trebuie efectuată având în vedere toate cele patru criterii de mai jos, asigurându-se că valorile de fiabilitate și relevanță sunt calculate într-un mod predefinit și consecvent:

1. numai datele obținute din secvențe complete de serii se califică pentru calcularea capacității estimative (acurateții) și variabilității intra-laborator și inter-laborator a metodei;
2. clasificarea finală pentru fiecare substanță chimică de referință pentru fiecare laborator participant trebuie obținută utilizându-se valoarea medie de viabilitate pentru diferitele serii din cadrul unei secvențe complete de serii de test;
3. numai datele obținute pentru substanțele chimice care au făcut obiectul unor secvențe complete de serii de teste în toate laboratoarele participante se califică pentru calcularea variabilității inter-laborator a metodei;
4. calcularea valorilor de acuratețe trebuie efectuată pe baza estimărilor laboratoarelor individuale obținute pentru cele 20 de substanțe chimice de referință de către diferite laboratoare participante.

În acest context, o **secvență de serii** constă din trei serii de teste independente per laborator pentru o singură substanță chimică de test. O **secvență completă de serii de teste** este o secvență de serii de la un laborator pentru o substanță chimică de test pentru care toate cele trei serii sunt valide. Aceasta înseamnă că oricare serie invalidă invalidează o întreagă secvență de trei serii.

*Reproductibilitatea intra-laborator*

10. Evaluarea reproductibilității intra-laborator trebuie să indice o concordanță a clasificărilor (categoria 2 și „nicio categorie” din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE) – obținute în serii de teste diferite și independente cu cele 20 de substanțe chimice de referință în cadrul aceluiași laborator – mai mare sau egală ( $\geq$ ) cu 90 %.

## ▼ M3

*Reproductibilitatea inter-laborator*

11. Evaluarea reproductibilității inter-laborator nu este esențială dacă metoda de testare propusă se utilizează numai într-un singur laborator. Pentru ca metodele să poată fi transferate inter-laborator, concordanța clasificărilor (categoria 2 și „nicio categorie” din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE) obținute în serii de teste diferite și independente cu cele 20 de substanțe chimice de referință, preferabil în cadrul a minimum trei laboratoare, trebuie să fie mai mare sau egală cu ( $\geq$ ) 80 %.

*Capacitatea de estimare (acuratețe)*

12. Precizia (sensibilitatea, specificitatea și acuratețea globală) a metodei similare sau modificate propuse trebuie să fie comparabilă cu cea a MRV sau mai bună decât aceasta, ținând cont de informațiile suplimentare referitoare la relevanța pentru speciile studiate (tabelul 2). Sensibilitatea trebuie să fie mai mare sau egală ( $\geq$ ) cu 80 % (2) (8) (23). Cu toate acestea, o restricție specifică suplimentară se aplică sensibilității metodei *in vitro* propuse în măsura în care doar două substanțe chimice *in vivo* din categoria 2, *1-decanol* și *disulfura de di-n-propil*, ar putea fi clasificate incorect ca „nicio categorie” de mai multe laboratoare participante. Specificitatea trebuie să fie mai mare sau egală ( $\geq$ ) cu 70 % (2) (8) (23). Nu există alte restricții cu privire la specificitatea metodei *in vitro* propuse, și anume oricare laborator participant poate clasifica incorect orice substanță chimică *in vivo* în categoria „nicio categorie” atât timp cât specificitatea finală a metodei de testare se află în plaja de valori acceptabile. Precizia globală trebuie să fie mai mare sau egală ( $\geq$ ) cu 75 % (2) (8) (23). Deși sensibilitatea MRV calculată pentru cele 20 de substanțe chimice de referință menționate în tabelul 1 este egală cu 90 %, valoarea de sensibilitate minimă definită solicitată pentru ca oricare metodă similară sau modificată să fie considerată validă este stabilită la 80 % deoarece atât *1-decanol* (o substanță chimică de limită), cât și *disulfura de di-n-propil* (o substanță fals negativă a MRV) sunt cunoscute ca fiind neiritante la om (31) (32) (33), deși au fost identificate ca iritante la teste pe iepuri. Deoarece modelele de RhE se bazează pe celule de origine umană, acestea pot estima respectivele substanțe chimice ca fiind neiritante (nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE).

Tabelul 2

**Valorile estimative pentru sensibilitate, specificitate și acuratețe globală prevăzute pentru ca oricare metodă similară sau modificată să fie considerată validă**

| Sensibilitate | Specificitate | Acuratețe globală |
|---------------|---------------|-------------------|
| $\geq 80 \%$  | $\geq 70 \%$  | $\geq 75 \%$      |

*Criterii de acceptare a studiului*

13. Este posibil ca unul sau mai multe teste privind una sau mai multe substanțe chimice să nu îndeplinească criteriile de acceptare a testului pentru substanțele de test și substanțele martor sau să nu fie acceptabile din alte motive. Pentru a completa datele lipsă, pentru fiecare substanță chimică de test se admite un număr maxim de două teste adiționale („o nouă testare”). Mai exact, deoarece în cazul noului test trebuie testate concomitent și substanțe martor pozitive și negative, poate fi efectuat un număr maxim de două serii suplimentare pentru fiecare substanță chimică de test.
14. Nu este exclus ca și după noul test numărul minim de trei serii valide solicitat pentru fiecare substanță chimică de test să nu fie obținut pentru fiecare substanță chimică de referință în fiecare laborator participant, conducând la o structură incompletă de date. În astfel de cazuri, pentru a considera seturile de date ca fiind acceptabile, trebuie îndeplinite cumulativ următoarele trei criterii:

1. Toate cele 20 de substanțe chimice de referință trebuie să fi făcut obiectul a cel puțin unei secvențe complete de serii de teste.

**▼ M3**

2. În fiecare din cel puțin trei laboratoare participante, trebuie să fie finalizate cel puțin 85 % dintre secvențele de serii (pentru 20 de substanțe chimice; și anume, sunt permise 3 secvențe de serii invalide într-un singur laborator).
3. Trebuie să fie finalizate cel puțin 90 % dintre toate secvențele de serii posibile provenind de la cel puțin trei laboratoare (pentru 20 de substanțe chimice testate în 3 laboratoare; și anume, sunt permise 6 secvențe de serii invalide în total).

## ▼ M2

**B.47. METODA DE TESTARE A OPACITĂȚII ȘI PERMEABILITĂȚII CORNEENE LA BOVINE PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV SAU UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR**

INTRODUCERE

1. Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* - BCOP) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu anumite limite de aplicare, în scopul încadrării substanțelor și amestecurilor în categoria „substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular”(1) (2) (3). În sensul prezentei metode de testare, substanțele cu potențial iritant sever sunt definite drept substanțele care induc la iepure leziuni oculare persistente cel puțin 21 de zile după administrare. Deși metoda BCOP nu este considerată adecvată pentru a substitui în totalitate testul *in vivo* pe ochi de iepure, se recomandă utilizarea acestei metode ca parte a strategiei de testare progresivă pentru clasificarea și etichetarea în scopul reglementării în cadrul unui anumit domeniu de aplicabilitate (4) (5). Substanțele și amestecurile de testare (6) pot fi clasificate drept substanțe având un caracter coroziv sau un potențial iritant fără a se efectua teste suplimentare pe iepuri. O substanță al cărui rezultat este negativ va trebui să fie testată pe iepuri prin intermediul unei strategii de testare secvențiale, astfel cum este descris în orientarea OCDE privind testarea nr. 405 (7) (capitolul B.5 din prezenta anexă).
2. Scopul metodei de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul coroziv sau iritant sever la nivel ocular al unei substanțe de test, astfel cum rezultă din capacitatea acesteia de a induce opacitatea și permeabilitatea crescută a unei corneee izolate de bovină. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin: (i) scăderea transmisiei luminii (opacitate) și (ii) creșterea pătrunderii colorantului fluoresceină sodică (permeabilitate). Evaluarea opacității și a permeabilității corneei după expunerea la o substanță de test se combină pentru a deduce un scor de evaluare a efectelor iritante *in vitro* (*In Vitro Irritancy Score* - IVIS), care se utilizează pentru clasificarea nivelului de iritabilitate a substanței de test.
3. Metoda de testare BCOP a mai fost utilizată pentru testarea unor substanțe cu potențial iritant la nivel ocular, care provoacă leziuni care se vindecă în mai puțin de 21 de zile, și a unor substanțe neiritante. Totuși, precizia și fiabilitatea metodei de încercare BCOP privind substanțele din aceste categorii nu au fost deocamdată evaluate în mod oficial.
4. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Metoda de testare are la bază protocolul metodei de testare BCOP al Comitetului de Coordonare Interagenții cu privire la Validarea Metodelor Alternative (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM) (8), care a fost dezvoltat în urma unui studiu internațional de validare (4)(5)(9), cu participări din partea Centrului European pentru Validarea Metodelor Alternative (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM) și a Centrului Japonez pentru Validarea Metodelor Alternative (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods* - JaCVAM). Protocolul are la bază informațiile obținute de la Institutul pentru științe *in vitro* (*Institute for in vitro sciences* - IIVS) și Protocolul 124 al INVITTOX (10), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de prevalidare al analizei BCOP sponsorizat de Comunitatea Europeană și derulat în perioada 1997-1998. Cele două protocoale se bazează pe metodologia tehnicii BCOP raportată pentru prima dată de Gautheron et al. (11).



## ▼ M2

6. Limitele de aplicare identificate pentru metoda de testare se datorează ratei ridicate de rezultate fals pozitive pentru alcooli și cetone și ratei ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide, observate la nivelul bazei de date de validare [a se vedea alineatul (44)] (5). Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia BCOP în funcție de sistemele de clasificare ale UE, EPA și SGA este substanțial ameliorată (5). Având în vedere scopul acestei evaluări (identificarea doar a corozivilor/iritanților severi la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative nu sunt critice, deoarece substanțele de acest tip vor fi testate ulterior pe iepuri sau utilizate în cadrul altor teste *in vitro* validate corespunzător, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențială, printr-o abordare având la bază forța probantă a datelor. În plus, baza de date actuală privind validările nu a permis o evaluare adecvată a unor clase chimice sau de produse (de exemplu, amestecurile). Totuși, inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea metodei pentru testarea tuturor tipurilor de materiale (inclusiv amestecuri), în urma căreia un rezultat pozitiv ar putea fi acceptat ca indicator al unei reacții oculare corozive sau sever iritante. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor trebuie interpretate cu prudență, având în vedere riscul de supraestimare.
7. Toate procedurile care utilizează ochi și corneea de bovine trebuie să respecte reglementările și procedurile aplicabile ale instalației de testare cu privire la manipularea materialelor de origine animală, care includ țesuturile și fluidele tisulare fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (12).
8. O limitare a metodei de testare este aceea că, în pofida faptului că ia în considerare unele dintre efectele oculare evaluate prin metoda de testare a iritării ochiului de iepure și, într-o anumită măsură, severitatea acestora, nu acordă atenție leziunilor conjunctivale și iridiane. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare BCOP, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, evaluarea adâncimii inițiale a leziunii corneei pentru a se face o distincție între efectele ireversibile și cele reversibile (13). În sfârșit, metoda de testare BCOP nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.
9. În prezent se depun eforturi pentru a caracteriza utilitatea și limitele de aplicare ale analizei BCOP pentru identificarea substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante [a se vedea de asemenea alineatul (45)]. De asemenea, utilizatorii sunt încurajați să furnizeze organizațiilor de validare mostre și/sau date pentru evaluarea oficială a aplicațiilor potențiale ulterioare ale metodei de testare BCOP, inclusiv pentru identificarea substanțelor cu potențial iritant sever și a substanțelor neiritante.
10. Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată prezenta metodă trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra performanțele tehnice în ceea ce privește aplicarea metodei de testare BCOP, înainte de trimiterea datelor analizei BCOP în scopul clasificării reglementare a riscurilor.

## PRINCIPIUL TESTULUI

11. Metoda de testare BCOP este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale ale corneei bovine *in vitro*. În această metodă de testare, leziunea provocată de substanța de test este apreciată prin măsurătorile cantitative ale modificărilor opacității și permeabilității corneene cu ajutorul unui opacimetru și, respectiv, al unui spectrofotometru în lumină vizibilă. Ambele măsurători sunt utilizate pentru a calcula IVIS, care este folosit pentru a desemna o categorie de clasificare a riscului de a provoca efecte iritante *in vitro* pentru anticiparea potențialului iritant la nivel ocular *in vivo* al unei substanțe de test (a se vedea criteriile de decizie).

▼ **M2**

12. Metoda de testare BCOP utilizează cornee izolate de la ochii bovinelor proaspăt sacrificate. Opacitatea corneană este determinată cantitativ prin măsurarea transmisiei luminii prin cornee. Permeabilitatea este determinată cantitativ prin măsurarea cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate întreaga grosime a corneei, detectat în centrul camerei posterioare. Substanțele de test sunt aplicate la nivelul suprafeței epiteliale a corneei prin adăugare în camera anterioară a suportului cornean. Apendicele 3 prezintă o descriere și o diagramă a unui suport cornean utilizat în analiza BCOP. Suporturile corneene pot fi obținute din surse comerciale diverse sau pot fi confecționate.

**Sursa și vârsta ochilor bovini și selectarea speciilor de animale**

13. Bovinele trimise la abator sunt sacrificate de obicei pentru consumul uman sau în alte scopuri comerciale. Numai animalele sănătoase, considerate corespunzătoare pentru alimentația umană sunt utilizate ca sursă de cornee pentru BCOP. Deoarece bovinele au o greutate care variază în limite largi în funcție de rasă, vârstă și sex, nu există o greutate recomandată pentru animale în momentul sacrificării.
14. Utilizarea de ochi de la animale de vârste diferite poate conduce la variații ale dimensiunilor corneene. Corneele cu un diametru orizontal  $> 30,5$  mm și valori ale grosimii corneene centrale (*central corneal thickness-CCT*)  $\geq 1\,100$   $\mu\text{m}$  sunt obținute în general de la animale cu vârsta de peste opt ani, iar corneele cu diametrul orizontal  $< 28,5$  mm și CCT  $< 900$   $\mu\text{m}$ , de la bovine cu vârsta sub cinci ani (14). Din această cauză, nu se utilizează de obicei ochii de la animale cu vârsta de peste 60 de luni. În mod obișnuit, nu s-au utilizat ochi de la bovine cu vârsta sub 12 luni deoarece, în acest caz, globii oculari sunt în creștere, iar grosimea și diametrul corneei sunt considerabil mai mici decât cele raportate pentru ochii provenind de la animalele mature. Cu toate acestea, utilizarea corneelor de la animale tinere (adică cele cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 luni) este permisă deoarece prezintă o serie de avantaje, cum ar fi disponibilitatea sporită, un interval de vârstă mai limitat și riscuri diminuate în ceea ce privește expunerea potențială a lucrătorilor la encefalopatia bovină spongiformă (15). Deoarece evaluarea suplimentară a efectului dimensiunii sau grosimii corneei asupra sensibilității la substanțe corozive sau iritante este valoroasă, utilizatorii sunt încurajați să raporteze vârsta estimativă și/sau greutatea animalelor de la care provin corneele folosite în studiu.

**Colectarea și transportul ochilor la laborator**

15. Ochii sunt colectați de angajații abatorului. Pentru a reduce la minim lezarea mecanică sau de altă natură a ochilor, aceștia trebuie enucleați cât mai curând posibil după sacrificare. Pentru a preveni expunerea ochilor la substanțe cu potențial iritant, angajații abatorului nu trebuie să utilizeze detergenți la spălarea capului animalului.
16. Ochii trebuie imersați complet în soluție salină echilibrată Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution* - HBSS), într-un recipient cu dimensiuni adecvate, și transportați la laborator într-un mod care să diminueze deteriorarea și/sau contaminarea bacteriană. Deoarece ochii sunt colectați în timpul procesului sacrificării, lucrătorii ar putea fi expuși la sânge sau la alte substanțe biologice, inclusiv bacterii și alte microorganisme. Din acest motiv este important să se asigure reducerea la minim a riscului de contaminare [de exemplu, prin păstrarea în gheață a recipientului care conține ochii, prin adăugarea de antibiotice la HBSS utilizat pentru a păstra ochii în timpul transportului (de exemplu, penicilină în concentrație de 100 UI/ml și streptomycină, 100  $\mu\text{g/ml}$ )].

▼ **M2**

17. Perioada de timp dintre colectarea ochilor și utilizarea corneelor în analiza BCOP trebuie să fie redusă (în mod normal colectate și utilizate în aceeași zi) și trebuie să se demonstreze că nu compromise rezultatele testării. Aceste rezultate au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile de control pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să aparțină aceluiași grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.

**Criterii de selecție pentru ochii utilizați în metoda BCOP**

18. În momentul în care ajung la laborator, ochii sunt examinați cu atenție pentru depistarea defectelor, inclusiv a opacității, zgârieturilor și neovascularizării. Numai corneele care provin de la ochi lipsiți de asemenea defecte urmează să fie utilizați.
19. De asemenea, calitatea fiecărei corneee este evaluată în ultimele etape ale analizei. Corneele care au o opacitate mai mare de șapte unități de opacitate (NOTĂ: opacimetrul trebuie calibrat cu standarde care sunt utilizate pentru stabilirea unităților de opacitate, a se vedea apendicele 3) după o perioadă de echilibrare inițială de o oră, urmează să fie îndepărtate.
20. Fiecare grup de tratament (substanță de test, martori pozitivi și negativi testați în paralel) este reprezentat de minim trei ochi. În analiza BCOP trebuie utilizate trei corneee în calitate de corneee martor negativ. Deoarece toate corneele sunt excizate din globul integral și montate în camerele corneene, există posibilitatea producerii de artefacte din cauza manipulării în ceea ce privește valorile opacității corneene individuale și ale permeabilității (inclusiv martorul negativ). În plus, valorile opacității și permeabilității pentru corneele martor negative sunt utilizate pentru a corecta în calculele IVIS valorile permeabilității și opacității corneene ale articolului de test și cele ale martorului pozitiv tratat.

**PROCEDURĂ****Pregătirea ochilor**

21. Corneele fără defecte sunt disecate cu menținerea unei margini de 2 până la 3 mm de sclerotică pentru a ajuta la manipularea ulterioară, luându-se precauții pentru a preveni lezarea epiteliului și a endoteliului corneei. Corneele izolate sunt montate în suporturi corneene special proiectate care constau din compartimente anterioare și posterioare, care sunt strâns legate de partea epitelială și, respectiv, de partea endotelială a corneei. Ambele camere sunt umplute cu un exces de mediu Eagle esențial minimal (*Eagle's Minimum Essential Medium* - EMEM) preîncălzit (mai întâi camera posterioară), asigurându-se că nu se formează bule. Dispozitivul este apoi echilibrat la  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  timp de cel puțin o oră, pentru a permite corneelor să se echilibreze cu mediul și, în măsura în care este posibil, să desfășoare o activitate metabolică normală (temperatura aproximativă a suprafeței corneene *in vivo* este de  $32^\circ\text{C}$ ).
22. După perioada de echilibrare, în ambele camere se adaugă EMEM proaspăt preîncălzit și sunt efectuate citirile nivelului de bază pentru opacitatea fiecărei corneee. Toate corneele care prezintă leziuni tisulare macroscopice (de exemplu, zgârieturi, pigmentare, neovascularizare) sau o opacitate  $> 7$  unități de opacitate sunt îndepărtate. Se calculează opacitatea medie a tuturor corneelor echilibrate. Cel puțin trei corneee cu valori ale opacității apropiate de valoarea medie a tuturor corneelor sunt selectate drept corneee martor negativ (sau solvent). Corneele rămase sunt distribuite apoi în grupuri de tratament și grupuri martor pozitiv.

## ▼ M2

23. Deoarece căldura specifică a apei este mai mare decât cea a aerului, cea dintâi asigură condiții de temperatură pentru incubare mai stabile. Prin urmare, se recomandă utilizarea unei băi de apă pentru menținerea suportului cornean și a conținutului acestuia la temperatura de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Totuși, se pot utiliza de asemenea incubatoarele cu aer, dacă se iau precauții pentru menținerea stabilității temperaturii (de exemplu, prin preîncălzirea suporturilor și a mediilor).

**Aplicarea substanței de test**

24. Se utilizează două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțe lichide și agenți tensioactivi (solide sau lichide) și altul pentru substanțe solide lipsite de activitate de suprafață.
25. Substanțele lichide sunt testate în stare nediluată, iar agenții tensioactivi sunt testați la o concentrație de 10 % procente masice pe unitate de volum într-o soluție de clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent cu privire la care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În mod normal, substanțele semisolide, cremele și cerurile sunt testate în același mod ca și substanțele lichide. Trebuie oferită o justificare adecvată pentru concentrații de diluare alternative. Corneele sunt expuse la substanțe lichide și agenți tensioactivi timp de 10 minute. Utilizarea altor durate de expunere trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată.
26. În mod normal, substanțele solide lipsite de activitate de suprafață sunt testate sub formă de soluții sau suspensii cu o concentrație de 20 % într-o soluție de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În anumite circumstanțe și cu o justificare științifică adecvată, și substanțele solide pot fi testate în stare pură prin aplicarea directă pe suprafața corneană prin utilizarea metodei camerei deschise (a se vedea paragraful 29). Corneele sunt expuse substanțelor solide timp de patru ore, dar, la fel ca în cazul lichidelor sau al agenților tensioactivi, pot fi utilizate durate de expunere alternative cu o argumentare științifică corespunzătoare.
27. În funcție de natura fizică și caracteristicile chimice (de exemplu, substanțe solide, lichide, vâscoase, comparativ cu lichide nevâscoase) ale substanței de test, se pot utiliza diferite metode de tratament. Factorul critic asigură faptul că substanța de test acoperă în mod adecvat suprafața epitelială și că este îndepărtată în mod corespunzător în timpul etapelor de spălare. În mod normal, pentru substanțele de test lichide nevâscoase sau ușor vâscoase, se utilizează o metodă cu camera închisă, iar pentru substanțele lichide semivâscoase și vâscoase, precum și pentru substanțele solide pure, se utilizează o metodă cu camera deschisă.
28. În cazul metodei cu camera închisă, prin orificiile de dozare de pe suprafața superioară a camerei se introduce în camera anterioară suficientă substanță de test (750  $\mu\text{l}$ ) pentru a acoperi porțiunea epitelială a corneei, iar orificiile sunt ulterior sigilate cu ajutorul dopurilor camerei în timpul expunerii. Este important să se asigure expunerea fiecărei cornee la o substanță de test pentru perioada de timp adecvată.
29. În cazul metodei cu camera deschisă, inelul de fixare a ferestrei și fereastra de sticlă din camera anterioară sunt îndepărtate înainte de tratament. Substanța martor sau substanța de test (750  $\mu\text{l}$ , sau substanță de test în cantitate suficientă pentru a acoperi complet corneea) sunt aplicate direct pe suprafața epitelială a corneei cu ajutorul unei micropipete. Dacă o substanță de test este dificil de pipetat, substanța de test poate fi încărcată sub presiune într-o pipetă care funcționează pe principiul dezlocuirii pozitive pentru a ajuta dozarea. Vârful unei astfel de pipete este introdus în vârful de distribuție al seringii astfel încât materialul să poată fi încărcat sub presiune în vârful de dezlocuire. Pistonul seringii este apăsat în timp ce pistonul pipetei este tras în sus. Dacă la nivelul vârfului pipetei apar bule de aer, articolul de test este îndepărtat (expulzat) și procedeul se repetă până când vârful se umple fără a exista bule de aer. Dacă este necesar, se poate utiliza o seringă normală (fără ac) deoarece permite măsurarea unui volum precis de substanță de test și o aplicare mai ușoară la nivelul suprafeței epiteliale a corneei. După dozare, fereastra de sticlă este înlocuită la nivelul camerei anterioare pentru a recrea un sistem închis.

▼ **M2****Incubarea post-expunere**

30. După perioada de expunere, se îndepărtează din camera anterioară substanța de test, martorul negativ sau martorul pozitiv, iar epiteliul este spălat de cel puțin trei ori (sau până când nu se mai constată vizual prezența substanței de test) cu EMEM (care conține roșu fenol). Pentru spălare se utilizează un mediu care conține roșu fenol deoarece schimbarea de culoare a acestui indicator poate fi monitorizată pentru determinarea eficienței spălării materialelor acide sau alcaline. Corneele sunt spălate de mai mult de trei ori dacă roșul fenol este în continuare decolorat (galben sau purpuriu) sau dacă substanța de test este în continuare vizibilă. După ce mediul nu mai conține substanță de test, corneele sunt spălate pentru ultima dată cu EMEM (fără roșu fenol). EMEM (fără roșu fenol) se utilizează pentru spălarea finală pentru a se asigura îndepărtarea substanței roșu fenol din camera anterioară înainte de măsurarea opacității. Camera anterioară se reumple apoi cu EMEM fără roșu fenol.
31. În cazul lichidelor sau al agenților tensioactivi, după spălare, corneele sunt incubate pentru o perioadă suplimentară de două ore la  $32 \pm 1$  °C. Un interval post-expunere mai lung poate fi util în anumite circumstanțe și necesitatea acestuia va fi examinată de la caz la caz. Corneele tratate cu substanțe solide sunt spălate amănunțit după o perioadă de expunere de patru ore, fără a fi necesară o incubare suplimentară.
32. Opacitatea și permeabilitatea fiecărei corneee se înregistrează la sfârșitul perioadei de incubare post-expunere, în cazul substanțelor lichide și al agenților tensioactivi, și la sfârșitul unei perioade de expunere de patru ore în cazul substanțelor solide lipsite de activitate de suprafață. În plus, fiecare corneee se examinează vizual, înregistrându-se observațiile pertinente (de exemplu, exfolierea țesuturilor, reziduuri de substanță de test, tipare de opacifiere neuniformă). Observațiile respective pot fi importante deoarece se pot reflecta în variații ale citirilor opacimetrului.

**Substanțe de control**

33. În fiecare experiment sunt incluși martori negativi sau grupuri martor solvenți/eluenți și martori pozitivi testați în paralel.
34. Atunci când se testează o substanță lichidă cu puritate de 100 %, în metoda de testare BCOP se include un martor negativ testat în paralel (de exemplu, soluție de clorură de sodiu 0,9 % sau apă distilată), pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. În plus, această metodă garantează faptul că nu va apărea o reacție de iritare din cauza condițiilor de analiză neadecvate.
35. Atunci când se testează o substanță lichidă diluată, un agent tensioactiv, sau o substanță solidă, în metoda de testare BCOP se include un grup martor solvent/eluent pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. Se poate utiliza numai un solvent/eluent în legătură cu care există dovezi că nu are efecte adverse asupra sistemului testat.
36. În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv constând într-un iritant ocular, pentru a se verifica dacă se produce un răspuns sever. Deoarece analiza BCOP este utilizată în această metodă de testare pentru a identifica substanțele care au un caracter coroziv sau un potențial iritant sever, în mod ideal martorul pozitiv ar trebui să fie o substanță de referință care induce o reacție severă. Totuși, pentru a garanta faptul că există posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției la martorul pozitiv, amplexarea reacției iritante nu trebuie să fie excesiv de mare.
37. Dimetilformamida sau soluția 1 % de hidroxid de sodiu sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțele de test lichide. Soluția de imidazol 20 % (procente masice pe unitate de volum) într-o soluție de clorură de sodiu 0,9 % reprezintă un exemplu de martor pozitiv pentru substanțele de test solide.

## ▼ M2

38. Substanțele etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei clase de substanțe sau de produse, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

**Caracteristici măsurate**

39. Opacitatea se determină prin măsurarea luminii transmise prin corneea. Opacitatea corneeană este măsurată cantitativ cu ajutorul unui opacimetru, conducând la valori ale opacității măsurate pe o scară continuă.
40. Permeabilitatea este determinată prin măsurarea cantitativă a fluoresceinei sodice care străbate toate straturile celulare corneene (de exemplu, epiteliul de pe suprafața exterioară a corneei prin endoteliul de pe suprafața interioară a corneei). Un ml de soluție de fluoresceină sodică (4 sau 5 mg/ml atunci când se testează substanțe lichide și agenți tensioactivi sau, respectiv, substanțe solide lipsite de activitate de suprafață) se adaugă în camera anterioară a suportului cornean, care se leagă strâns cu porțiunea epitelială a corneei, iar camera posterioară, care se leagă strâns cu porțiunea endotelială a corneei, este umplută cu EMEM proaspăt. Suportul este apoi incubat în poziție orizontală timp de  $90 \pm 5$  min la  $32 \pm 1$  °C. Cantitatea de fluoresceină sodică care pătrunde în camera posterioară este măsurată cantitativ cu ajutorul unui spectrofotometru UV/VIS. Măsurătorile spectrofotometrice efectuate la 490 nm sunt înregistrate sub formă de valori ale densității optice ( $DO_{490}$ ) sau ale absorbanței, care sunt măsurate pe o scară continuă. Valorile permeabilității fluoresceinei sunt determinate prin utilizarea valorilor  $DO_{490}$  înregistrate de un spectrofotometru în lumină vizibilă care folosește valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei.
41. Ca o variantă alternativă, se poate utiliza un cititor de plăci cu 96 de godeuri cu microtitrare cu condiția: (i) să se poată stabili domeniul linear al cititorului de plăci pentru determinarea valorilor  $DO_{490}$  a fluoresceinei; și (ii) să se utilizeze volumul corect de mostre de fluoresceină în placa cu 96 de godeuri pentru a se obține valori ale  $DO_{490}$  echivalente cu valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei [acest aspect ar putea necesita un godeu umplut complet (în mod obișnuit 360  $\mu$ l)].

**DATE ȘI RAPORTARE****Evaluarea datelor**

42. După corectarea valorilor opacității și ale permeabilității medii ( $DO_{490}$ ) pentru valorile opacității de fundal și a permeabilității martorului negativ  $DO_{490}$ , valorile medii ale opacității și ale permeabilității  $DO_{490}$  pentru fiecare grup de tratament trebuie combinate într-o formulă dedusă în mod empiric pentru a calcula un scor de evaluare a efectelor iritante *in vitro* (*in vitro irritancy score* - IVIS) pentru fiecare grup de tratament după cum urmează:

IVIS = valoarea opacității medii + ( $15 \times$  valoarea permeabilității medii  $DO_{490}$ )

Sina *et al.* (16) au raportat că această formulă a fost dedusă în urma unor studii interne și a studiilor realizate prin colaborarea mai multor laboratoare. Datele generate pentru o serie de 36 de compuși într-un studiu inter-laboratoare au fost supuse unei analize multivariante pentru a determina ecuația cea mai potrivită pentru datele *in vivo* și cele *in vitro*. Analiza a fost efectuată de cercetători de la două companii diferite, care au obținut ecuații aproape identice.

43. Valorile opacității și permeabilității trebuie de asemenea evaluate independent pentru a determina, prin utilizarea doar a uneia dintre cele două caracteristici (a se vedea criteriile de decizie), dacă o substanță de test a provocat corozivitatea sau iritarea severă.

▼ **M2****Criterii de decizie**

44. O substanță care provoacă o valoare a IVIS  $\geq 55,1$  este definită ca fiind corozivă sau având un potențial iritant sever. Astfel cum s-a arătat la punctul 1, dacă substanța de test nu este identificată drept substanță cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, trebuie efectuate testări suplimentare în scopul clasificării și etichetării. Prin comparație cu datele metodei de testare *in vivo* pe ochi de iepure, clasate în conformitate cu sistemele de clasificare EPA (1), UE (2) sau GHS (3), metoda de testare BCOP are o precizie totală cuprinsă între 79 % (113/143) și 81 % (119/147), o rată de rezultate fals pozitive cuprinsă între 19 % (20/103) și 21 % (22/103), și o rată de rezultate fals negative cuprinsă între 16 % (7/43) și 25 % (10/40). Atunci când din baza de date sunt excluse substanțe din anumite clase chimice (de exemplu, alcoolii, cetone) sau fizice (de exemplu, substanțe solide), precizia metodei BCOP raportată la sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este cuprinsă între 87 % (72/83) și 92 % (78/85), rata de rezultate fals pozitive este cuprinsă între 12 % (7/58) și 16 % (9/56), iar rata de rezultate fals negative între 0 % (0/27) și 12 % (3/26).
45. Chiar dacă pentru o substanță de test nu se obține încadrarea în clasa substanțelor având caracter coroziv sau potențial iritant sever, datele BCOP pot fi utile coroborate cu datele de testare obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure sau printr-o testare *in vitro* validată în mod corespunzător, pentru a evalua în continuare utilitatea și limitele de aplicare ale metodei de testare BCOP în ceea ce privește identificarea substanțelor având un potențial iritant redus și a celor neiritante (sunt în curs de elaborare linii directoare privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare).

**Criterii de acceptare a studiului**

46. Un test este considerat acceptabil dacă pentru martorul pozitiv se obține o valoare a IVIS cuprinsă în intervalul reprezentat de două deviații standard ale mediei istorice actuale, care trebuie actualizată la fiecare trei luni, sau de fiecare dată când un test care poate fi acceptat este efectuat în laboratoare în care testele sunt realizate rar (adică mai puțin de o dată pe lună). Reacțiile negative sau cele ale grupului martor solvent/eluent trebuie să conducă la valori ale opacității și permeabilității care sunt mai mici decât limitele superioare stabilite ale valorilor opacității și permeabilității fundalului pentru corneele de bovine tratate cu martorii negativi sau cu grupurile martor solvent/eluent respective.

**Raport de testare**

47. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

*Substanțe testate și de control*

Denumire (denumiri) chimică (chimice), precum denumirea structurală utilizată de *Chemical Abstracts Service* (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

Numărul de înregistrare (*Registry Number* -RN) CAS, dacă se cunoaște;

Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) de greutate], în măsura în care informația respectivă este disponibilă;

Proprietăți fizico-chimice, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;

Tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

Stabilitatea, dacă se cunoaște.



▼ **M2***Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare*

Numele și adresa sponsorului, a instalației de testare și a directorului de studiu;

Identificarea sursei ochilor (și anume întreprinderea unde au fost colectați);

Condițiile de depozitare și transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp până la începerea testării, mediile de transport și condițiile de temperatură, toate antibioticele utilizate);

Dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, vârsta, sexul, greutatea animalului donator).

*Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat**Integritatea metodei de testare*

Procedura utilizată pentru a asigura integritatea în timp (și anume, precizia și fiabilitatea) a metodei de testare (de exemplu, testarea periodică a substanțelor de verificare, utilizarea datelor istorice de control negative și pozitive).

*Criteriile pentru un test acceptabil*

Domenii acceptabile pentru martorii pozitivi și negativi testați în paralel pe baza datelor istorice;

După caz, domenii pentru martorii etalon acceptabili testați în paralel pe baza datelor istorice.

*Condiții de testare*

Descrierea sistemului de testare utilizat;

Tipul de suport cornean utilizat;

Informații privind calibrarea pentru dispozitivele utilizate pentru măsurarea opacității și a permeabilității (de exemplu, opacimetru și spectrofotometru);

Informații privind corneele bovine utilizate, inclusiv specificații privind calitatea acestora;

Detalii privind procedura de testare utilizată,

Concentrația (concentrațiile) substanței de test utilizate;

Descrierea tuturor modificărilor procedurii de testare;

Trimiteri la datele istorice ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de verificare, substanțe etalon);

Descrierea criteriilor de evaluare folosite.

*Rezultate*

Prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute cu fiecare mostră de testare [de exemplu, valorile opacității și ale  $DO_{490}$  precum și IVIS calculat pentru substanța de test și martorii pozitivi negativi și etalon (dacă se includ), raportate sub formă de tabel, inclusiv datele de la reproducere repetă experimentele după caz, și mediile  $\pm$  deviația standard pentru fiecare experiment];

Descrierea altor efecte observate.

*Discutarea rezultatelor**Concluzie*

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.



## ▼ M2

- (2) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006. JO L 353, 31.12.2008 p. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - GHS (*Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice*): Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Disponibil la:  
  
[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)]
- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Document disponibil la adresa:  
  
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)]
- (6) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 396, 30.12.2006, p. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)]
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)]
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)]
- (10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼ **M2**

- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Document disponibil la adresa:  
  
[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Document disponibil la adresa:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

▼ **M2***Apendicele 1***DEFINIȚII**

**Precizie:** Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

**Substanță etalon:** O substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

**Corneea:** Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

**Opacitate corneeană:** Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță de test. Opacitatea corneeană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei. Opacitatea poate fi evaluată în mod subiectiv, astfel cum se procedează în cazul testului Draize pe ochi de iepure, sau în mod obiectiv, cu ajutorul unui instrument cum este „opacimetrul”.

**Permeabilitatea corneeană:** Măsurarea cantitativă a lezării epiteliului cornean printr-o determinare a cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare ale corneei.

**Categoria EPA 1:** Caracter coroziv (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau afectare a corneei sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (1).

**Categoria UE R41:** Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (2).

**Rată de rezultate fals negative:** Proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

**Rată de rezultate fals pozitive:** Proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice):** Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de riscuri fizice, riscuri pentru sănătate și riscuri pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, fraze de pericol, fraze de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protecției populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (3).

▼ **M2**

**Categoria HS 1:** Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (3).

**Risc:** Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, sistem sau (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

**Scor de evaluare a efectelor iritante *in vitro* (IVIS):** O formulă dedusă în mod empiric utilizată în analiza BCOP în care valorile opacității medii și cele ale permeabilității medii pentru fiecare grup de tratament sunt combinate într-un scor *in vitro* unic pentru fiecare grup de tratament. IVIS = valoarea opacității medii + (15 x valoarea permeabilității medii).

**Martor negativ:** O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța de test și cu alte probe martor pentru a determina dacă solvenul interacționează cu sistemul testat.

**Substanță neiritantă:** Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III, în categoriile UE R41 sau R36; sau categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari.

**Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular:** (a) Substanță care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

**Iritant ocular:** (a) Substanță care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria EPA II sau III, categoria UE R36, sau categoria GHS 2A sau 2B de iritanți oculari (1) (2) (3).

**Substanță cu potențial iritant sever:** (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu se vindecă în 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

**Opacimetru:** Instrument utilizat pentru a măsura „opacitatea corneană” prin evaluarea cantitativă a transmisiei luminii prin corneă. Instrumentul tipic are două compartimente, fiecare dintre acestea fiind dotat cu propria sursă de lumină și propria celulă fotoelectrică. Unul dintre compartimente este utilizat pentru corneea tratată, iar cel de-al doilea servește pentru a calibra și a regla punctul de zero al instrumentului. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele între lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și se afișează valoarea numerică a opacității pe un ecran digital.

**Controlul pozitiv:** O probă replică conținând toate componentele sistemului testat și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

**▼ M2**

**Fiabilitate:** Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

**Martor solvent/eluent:** O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau eluentul, care este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța de test dizolvată în același solvent sau eluent. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau eluentul interacționează cu sistemul testat.

**Testare secvențială:** O strategie de testare în trepte în cadrul căreia sunt revizuite toate informațiile existente privind o substanță de test, într-o anumită ordine, utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se execută o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate face o clasificare lipsită de echivoc.

**Metodă de testare validată:** Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv precizia) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

**Forța probantă:** Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a ajunge la o concluzie în ceea ce privește riscul potențial al unei substanțe și a susține concluzia respectivă.

## ▼ M2

## Apendicele 2

## Substanțe de verificare pentru metoda de testare BCOP

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, este posibil ca laboratoarele să dorească să demonstreze performanțele tehnice proprii, prin identificarea corectă a clasificării caracterului coroziv pentru cele 10 substanțe recomandate în tabelul 1. Substanțele au fost selectate pentru a reprezenta domeniul de reacții pentru iritația/coroziunea locală la nivelul ochilor, care se bazează pe rezultatele testului *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405), și anume, categoriile 1, 2A, 2B, sau neclasificat și etichetat în conformitate cu GHS al Națiunilor Unite) (3) (7). Totuși, ținând cont de utilitatea validată a acestor analize (și anume, în scopul de a identifica numai substanțele care au caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile comercial, să fie disponibile informații de referință *in vivo* de calitate superioară și să existe date de calitate furnizate de două metode *in vitro* pentru indicațiile orientative de testare care se elaborează. Din acest motiv, substanțele iritante au fost selectate din lista recomandată ICCVAM care cuprinde 122 substanțe de referință pentru validarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare (a se vedea Apendicele H: Substanțe de referință recomandate ICCVAM) (5). Informațiile de referință sunt disponibile în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metodele de testare a BCOP și a ochiului izolat de pui (*Isolated Chicken Eye* - ICE) (17) (18).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda BCOP

| Substanță                    | CAS RN    | Clasă chimică (1)      | Formă fizică: | Clasificare <i>in vivo</i> (2) | Clasificare <i>in vitro</i> (3)        |
|------------------------------|-----------|------------------------|---------------|--------------------------------|--|
| Clorură de benzalconiu (5 %) | 8001-54-5 | Compus de tip onium    | Lichid        | Categoria 1                    | Coroziv/Iritant sever                  |
| Clorhexidină                 | 55-56-1   | Amină, amidină         | Solid         | Categoria 1                    | Coroziv/Iritant sever                  |
| Acid dibenzoil-L-tartric     | 2743-38-6 | Acid carboxilic, ester | Solid         | Categoria 1                    | Coroziv/Iritant sever                  |
| Imidazol                     | 288-32-4  | Heterociclu            | Solid         | Categoria 1                    | Coroziv/Iritant sever                  |
| Acid tricloracetic (30 %)    | 76-03-9   | Acid carboxilic        | Lichid        | Categoria 1                    | Coroziv/Iritant sever                  |
| Clorură de 2,6-diclorbenzoil | 4659-45-4 | Halogenură de acil     | Lichid        | Categoria 2A                   | Necoroziv/Fără potențial iritant sever |
| Etil-2-metil-acetoacetat     | 609-14-3  | Cetonă, ester          | Lichid        | Categoria 2B                   | Necoroziv/Fără potențial iritant sever |
| Azotat de amoniu             | 6484-52-2 | Sare anorganică        | Solid         | Categoria 2A                   | Necoroziv/Fără potențial iritant sever |

▼ **M2**

| Substanță | CAS RN   | Clasă chimică <sup>(1)</sup> | Formă fizică: | Clasificare <i>in vivo</i> <sup>(2)</sup> | Clasificare <i>in vitro</i> <sup>(3)</sup> |
|-----------|----------|------------------------------|---------------|---|--|
| Glicerol  | 56-81-5  | Alcool                       | Lichid        | Neetichetat                               | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |
| n-Hexan   | 110-54-3 | Hidrocarbură (aciclică)      | Lichid        | Neetichetat                               | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |

Prescurtări: Nr. CASRN = Număr de înregistrare al *Chemical Abstracts Service*.

<sup>(1)</sup> Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță de test prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(2)</sup> Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS a Națiunilor Unite (3)(7).

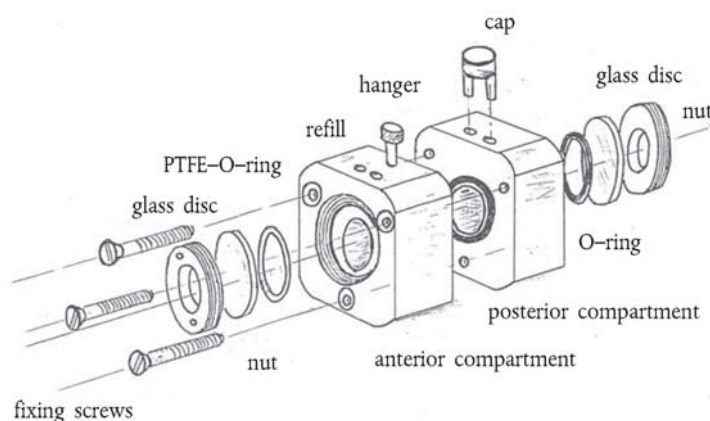
<sup>(3)</sup> Pe baza rezultatelor obținute prin analizele BCOP și ICE.

▼ **M2**

## Apendicele 3

## SUPPORT CORNEAN BCOP

1. Suporturile corneene BCOP sunt confecționate dintr-un material inert (de exemplu, polipropilenă). Suporturile sunt formate din două jumătăți (o cameră anterioară și una posterioară) și au două camere cilindrice interne similare. Fiecare cameră are un volum de 5 ml și conține la capăt un geam din sticlă, prin care se observă și se înregistrează opacitatea. Camerele interne au un diametru de 1,7 cm și o adâncime de 2,2 cm <sup>(1)</sup>. Eventualele scurgeri sunt prevenite cu ajutorul unei garnituri amplasate în camera posterioară. Corneele se plasează cu partea endotelială pe garnitura camerei posterioare, iar camerele interioare se plasează pe partea epitelială a corneelor. Camerele sunt fixate cu trei șuruburi din oțel inoxidabil aflate pe muchiile exterioare ale camerei. La capătul fiecărei camere se află un geam de sticlă amovibil, care permite accesul facil la cornee. De asemenea, se plasează o garnitură între geamul de sticlă și cameră pentru prevenirea scurgerilor. Două orificii situate în partea superioară a fiecăreia din cele două camere permit introducerea și îndepărtarea mediului și compușilor de testare. Aceste orificii sunt închise cu capace de cauciuc pe perioadele de tratament și de incubație.



## Glosar

|                        |                          |
|------------------------|--------------------------|
| Glass disc:            | Disc de sticlă           |
| PTFE-O-ring:           | Garnitură PTFE           |
| Refill:                | Orificiu de umplere      |
| Hanger:                | Cârlig                   |
| Cap:                   | Capac                    |
| Nut:                   | Șaibă                    |
| O-ring:                | Garnitură                |
| Posterior compartment: | Compartimentul posterior |
| Anterior compartment:  | Compartimentul anterior  |
| Fixing screws:         | Șuruburi de fixare       |

<sup>(1)</sup> Dimensiunile indicate se referă la un suport cornean utilizat pentru bovine a căror vârstă variază între 12 și 60 de luni. În cazul în care se folosesc animale cu vârsta cuprinsă între 6-12 luni, suportul trebuie să fie proiectat astfel încât volumul fiecărei camere să fie de 4 ml, iar fiecare dintre camerele interioare să aibă un diametru de 1,5 cm și o adâncime de 2,2 cm. Este foarte important ca raportul între suprafața zonei corneene expuse și volumul camerei posterioare a suporturilor corneene noi să fie identic cu raportul existent în cazul suportului cornean tradițional. Acest lucru este necesar pentru determinarea corectă a valorilor permeabilității, în scopul calculării IVIS prin formula propusă.



**▼ M2****OPACIMETRUL**

2. Opacimetrul este un dispozitiv de măsurare a transmisiei luminii. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele între lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și se afișează valoarea numerică a opacității pe un ecran digital. Se stabilesc unitățile de opacitate.
3. Opacimetrul trebuie să asigure un răspuns linear, aflat într-un interval de valori ale opacității corespunzătoare limitelor utilizate pentru diferitele clasificări prevăzute în modelul de predicție (de exemplu, până la limitele care provoacă corозиune/iritație severă). Pentru obținerea unor valori lineare și precise de până la 75-80 unități de opacitate, este necesară calibrarea opacimetrului cu ajutorul unor dispozitive etalon. Se introduc dispozitive etalon (foi opace de poliester) în camera de calibrare (o cameră corneană proiectată să conțină dispozitivele de calibrare) și se citesc valorile indicate de opacimetru. Camera de calibrare este proiectată astfel încât dispozitivele etalon sunt plasate la aproximativ aceeași distanță între sursa de lumină și celula fotoelectrică la care vor fi plasate corneele pe durata măsurării opacității. Mai întâi, opacimetrul este calibrat la 0 unități de opacitate, când în camera de calibrare nu este introdus niciun dispozitiv etalon. După aceasta, se plasează pe rând trei dispozitive etalon diferite în camera de calibrare și se măsoară opacitatea în fiecare caz. Dispozitivele etalon nr. 1, 2 și 3 trebuie să conducă la valori ale opacității egale cu valorile predeterminate de 75, 150 și, respectiv, 225 unități de opacitate, cu o variație de  $\pm 5\%$ .

▼ **M2****B 48 METODA DE TESTARE A OCHIULUI IZOLAT DE PUI PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV ȘI UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR**

## INTRODUCERE

1. Metoda de testare a ochiului izolat de pui (ICE) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite cazuri și cu anumite limite, în vederea clasificării unor substanțe și amestecuri ca fiind substanțe care au un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular (1) (2) (3). În scopul prezentei metode de testare, substanțele cu potențial iritant sever sunt iritanții a căror acțiune provoacă leziuni oculare care persistă la ieșire timp de cel puțin 21 de zile după administrare. Chiar dacă nu este considerată adecvată pentru a substitui în întregime testul *in vivo* pe ochi de iepure, metoda ICE este recomandată pentru a fi inclusă într-o strategie de testare secvențială privind clasificarea și etichetarea reglementară într-un domeniu de aplicabilitate specific (4) (5). Substanțele și amestecurile de testare (6) care se dovedesc pozitive după această evaluare pot fi clasificate ca fiind substanțe care au un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular, fără a mai fi necesară testarea pe iepuri. O substanță al cărui rezultat este negativ va trebui să fie testată pe iepuri prin intermediul unei strategii de testare secvențiale, astfel cum este descris în orientarea OCDE privind testarea nr. 405 (7) (capitolul B.5 din prezenta anexă).
2. Scopul prezentei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua caracterul coroziv sau sever iritant al unei substanțe de încercare, măsurat prin capacitatea acesteia de a induce toxicitate într-un ochi enucleat de pui. Efectele toxice asupra corneei sunt măsurate prin (i) o evaluare calitativă a opacității, (ii) o evaluare calitativă a leziunilor epitelului prin aplicarea de fluoresceină în ochi (retenția fluoresceinei), (iii) o măsurare cantitativă a creșterii grosimii (inflamare), și (iv) o evaluare calitativă a leziunilor morfologice macroscopice a suprafeței. Opacitatea, inflamarea și evaluarea leziunilor corneei după expunerea la o substanță de test se stabilesc în mod individual, apoi rezultatele se combină pentru a se obține un coeficient de iritare oculară.
3. Metoda de testare ICE a mai fost utilizată pentru testarea unor substanțe cu potențial iritant la nivel ocular, care provoacă leziuni care se vindecă în mai puțin de 21 de zile, și a unor substanțe neiritante. Totuși, precizia și fiabilitatea metodei de încercare ICE privind substanțele din aceste categorii nu au fost deocamdată evaluate în mod oficial.
4. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

## CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Această metodă de testare are la bază protocolul de testare ICE al Comitetului de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM) (8), elaborat în urma unui studiu internațional de validare (4) (5) (9) la care au contribuit Centrul european pentru validarea metodelor alternative, Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative și Departamentul TNO pentru calitatea vieții, toxicologie și farmacologie aplicată (Țările de Jos). Protocolul a fost întocmit pe baza informațiilor conținute în protocoalele publicate și în protocolul utilizat în prezent de către TNO (10) (11) (12) (13) (14).

## ▼ M2

6. Limitele de aplicare cunoscute ale acestei metode se referă la rata de rezultate fals pozitive privind alcoolii și ratele de rezultate fals negative privind substanțele solide și agenții tensioactivi (a se vedea punctul 47) (4). Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia ICE în funcție de sistemele de clasificare ale UE, EPA și SGA este substanțial ameliorată (4). Având în vedere scopul acestei evaluări (identificarea doar a corozivilor/iritanților severi la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative nu sunt foarte mari, deoarece substanțele de acest tip vor fi testate ulterior pe iepuri sau utilizate în cadrul altor teste *in vitro* validate corespunzător, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențială, printr-o abordare având la bază forța probantă a datelor. În plus, baza de date actuală privind validările nu a permis o evaluare adecvată a unor clase chimice sau de produse (de exemplu, amestecurile). Totuși, inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode pentru testarea tuturor tipurilor de materiale (inclusiv amestecuri), în urma căreia un rezultat pozitiv ar putea fi acceptat ca indicator al unei reacții oculare corozive sau sever iritante. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor trebuie interpretate cu prudență, având în vedere riscul de producere a unor prognoze imprecise.
7. Toate procedurile efectuate pe ochi de pui trebuie să respecte regulamentele și normele de manipulare a materialelor de origine umană sau animală, precum țesuturi și lichide tisulare, fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (15).
8. O limitare a metodei de testare este aceea că, în ciuda faptului că ia în considerare unele dintre efectele oculare evaluate prin metoda de testare a iritării ochiului de iepure și, într-o anumită măsură, severitatea acestora, nu acordă atenție leziunilor conjunctivale și iridiane. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare ICE, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, evaluarea adâncimii inițiale a leziunii corneei pentru a se face o distincție între efectele ireversibile și cele reversibile (16). În sfârșit, metoda de testare ICE nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.
9. Se depun eforturi permanente de continuare a caracterizării utilității și limitelor metodei de testare ICE de identificare a substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante (a se vedea și punctul 48). De asemenea, utilizatorii sunt încurajați să furnizeze specimene și/sau informații către organizațiile de validare, în vederea unei evaluări formale a posibilităților utilizării viitoare ale metodei de testare ICE, care pot consta inclusiv în identificarea substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante.
10. Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată prezenta metodă trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește aplicarea metodei de testare ICE înainte de a transmite datele analizei ICE în scopul clasificării reglementare a riscurilor.

## PRINCIPIUL TESTULUI

11. Metoda de testare ICE este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale a corneei de pui *in vitro*. În prezenta metodă de testare, leziunile provocate de substanța de testare sunt evaluate în funcție de inflamarea corneană, opacitate și retenția fluoresceinei. În timp ce ultimii doi parametri presupun o evaluare calitativă, analiza inflamării corneene asigură o evaluare cantitativă. Fiecare măsurare este transformată într-un scor cantitativ utilizat pentru a se calcula un indice general de iritare sau primește un indice calitativ utilizat pentru a desemna un grad al corozivității oculare și al iritării severe. Oricare dintre aceste două rezultate poate fi utilizat ulterior pentru a prognoza corozivitatea oculară *in vivo* și potențialul sever de iritare al unei substanțe de testare (a se vedea criteriile de decizie).

**▼ M2****Sursa și vârsta ochilor de pui**

12. Până în prezent, pentru această evaluare au fost utilizați ochi colectați de la pui sacrificați în abatoare pentru consumul uman, nefiind necesare animale de laborator. Sunt utilizați exclusiv ochi proveniți de la animale considerate adecvate pentru consumul uman.
13. Chiar dacă nu a fost efectuat un studiu controlat de evaluare a vârstei optime a puilor, vârsta și greutatea puilor utilizați până în prezent pentru acest test sunt cele ale puilor de primăvară prelucrați de obicei de un abator (aproximativ 7 săptămâni, 1,5 – 2,5 kg).

**Colectarea și transportul ochilor la laborator**

14. Capetele se îndepărtează imediat după sedarea puilor (de obicei, prin șoc electric) și incizia la nivelul gâtului pentru scurgerea sângelui. Se recomandă identificarea unei ferme de pui aflate în apropierea laboratorului, astfel încât capetele să fie transferate de la abator către laborator într-un timp suficient de scurt pentru a reduce riscul de deteriorare și/sau contaminare bacteriană. Perioada de timp dintre colectarea capetelor și utilizarea ochilor în metoda de testare ICE trebuie să fie redusă (în mod normal, se încadrează în 2 ore) și trebuie să se demonstreze că nu compromise rezultatele testării. Aceste rezultate au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile de control pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să aparțină aceluiași grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.
15. Deoarece ochii sunt disecați în laborator, capetele se transportă intacte de la abator, la temperatură ambiantă, în cutii de plastic, și se mențin umede cu prosoape înmuiate în soluție salină izotonică.

**Criterii de selecție pentru ochii utilizați în metoda ICE**

16. Sunt respinși ochii care, după enucleare, prezintă un nivel de bază ridicat al colorării cu fluoresceină (de exemplu, peste 0,5) sau opacitate corneană (de exemplu, peste 0,5).
17. Fiecare grup de testare și martor pozitiv este format din cel puțin trei ochi. Grupul martor negativ sau proba solvent (dacă se folosește un solvent diferit de soluția salină) constă din cel puțin un ochi.

**PROCEDURĂ****Pregătirea ochilor**

18. Pleoapele sunt excizate cu atenție, astfel încât să nu se lezeze corneea. Integritatea corneană este evaluată rapid cu ajutorul unei picături de soluție de fluoresceină de sodiu 2 % (procente masice pe unitate de volum) aplicată pe suprafața corneană timp de câteva secunde, care apoi se clătește cu soluție salină izotonică. Ochii tratați cu fluoresceină sunt apoi examinați cu un microscop oftalmologic, urmărindu-se eventualele leziuni ale corneei (cum ar fi valori ale retenției fluoresceinei și opacității corneene de maximum 0,5).
19. Dacă nu prezintă leziuni, ochiul este îndepărtat din orbită cu atenție, astfel încât corneea să nu fie lezată. Globul ocular este scos din orbită prin fixarea membranei nictitante cu ajutorul unui forceps chirurgical, apoi mușchii oculari se taie cu un foarfece îndoit, cu vârf bont. Este important să se evite lezarea corneei (leziuni de compresie) ca urmare a unei presări excesive.
20. Atunci când ochiul este îndepărtat din orbită, se păstrează atașată o porțiune vizibilă a nervului optic. După îndepărtarea din orbită, ochiul este plasat pe o suprafață absorbantă, iar membrana nictitantă și alte țesuturi conjunctive sunt eliminate.

▼ **M2**

21. Ochiul enucleat este prins cu o clemă din oțel inoxidabil, cu corneea poziționată vertical. Clema este introdusă apoi într-o cameră a aparatului de suprafuziune (16). Clemele sunt apoi introduse în aparatul de suprafuziune astfel încât corneea să fie irigată cu soluție izotonică. Temperatura camerelor aparatului de suprafuziune trebuie menținută la  $32 \pm 1,5$  °C. În appendicele 3 se prezintă o diagramă a aparatului tipic de suprafuziune și a clemelor pentru ochi, care pot achiziționate din comerț sau confecționate. Aparatul poate fi modificat pentru a respecta cerințele din anumite laboratoare (de exemplu, pentru un număr de ochi diferit).
22. După ce au fost introduși în aparatul de suprafuziune, ochii sunt examinați din nou cu un microscop oftalmologic pentru eventuale leziuni apărute în timpul procedurii de disecție. În acest moment, se măsoară grosimea corneei în vârful său, cu ajutorul dispozitivului de măsurare a adâncimii atașat microscopului oftalmologic. Ochii care prezintă: (i) un coeficient al retenției de fluoresceină de peste 0,5; (ii) opacitate corneeană de peste 0,5; sau (iii) orice semne suplimentare de leziuni, se înlocuiesc. În cazul ochilor care nu sunt respinși pe baza acestor criterii, se exclud ochii cu o grosime a corneei care deviază cu peste 10 % de la valoarea medie a tuturor ochilor. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscopul oftalmologic poate produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită. Această lățime se stabilește la 0,095 mm.
23. După examinarea și acceptarea ochilor, aceștia sunt incubați timp de aproximativ 45-60 minute pentru a fi echilibrați cu sistemul de testare anterior dozării. După perioada de echilibrare, se înregistrează o valoare de referință 0 a grosimii și opacității corneei, care va fi utilizată ca valoare de bază (de exemplu, momentul de timp egal cu 0). Cantitatea de fluoresceină determinată în momentul disecției este utilizată ca valoare de referință măsurată pentru acea caracteristică.

**Aplicarea substanței de test**

24. Imediat după măsurarea valorii de referință 0, ochiul (aflat în suportul său) este extras din aparatul de suprafuziune și plasat într-o poziție orizontală, iar pe corneea se aplică substanța de test.
25. De obicei, substanțele de test lichide se testează nediluate, dar pot fi diluate dacă se consideră necesar (de exemplu, în cadrul elaborării testelor). Solventul preferat pentru substanțele diluate este serul fiziologic. Totuși, în condiții controlate pot fi utilizați solvenți alternativi, dar oportunitatea solvenților diferiți de serul fiziologic nu a fost demonstrată.
26. Substanțele de test lichide se aplică pe corneea astfel încât întreaga suprafață a acesteia să fie acoperită uniform cu substanța de test; volumul standard este de 0,03 ml.
27. Dacă este posibil, substanțele solide se macină cât mai fin posibil cu ajutorul unui mojar cu pistil sau al unui instrument de măcinat comparabil. Pulberea se aplică pe corneea astfel încât suprafața să fie acoperită uniform cu substanța de test; cantitatea standard este de 0,03 g.
28. Substanța de test (lichidă sau solidă) se aplică timp de 10 secunde, după care ochiul se clătește cu soluție salină izotonică (aproximativ 20 ml) la temperatura camerei. După aceasta, ochiul (în suportul său) este reintrodus în aparatul de suprafuziune, în poziția verticală inițială.

**Substanțe de control**

29. În fiecare experiment se introduc martori negativi sau martori eluenți și martori pozitivi.

## ▼ M2

30. Atunci când se testează substanțe lichide 100 % sau substanțe solide prin metoda de testare ICE, se utilizează ser fiziologic ca martor negativ pentru a se detecta modificări nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare.
31. Atunci când sunt testate substanțe lichide diluate, metoda de testare prevede un grup de martori solvenți/eluenți prin care se detectează modificările nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare. Conform punctului 25, se poate utiliza doar un solvent/eluent care nu afectează în mod negativ sistemul de încercare.
32. În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv constând într-un iritant ocular, pentru a se verifica dacă se produce un răspuns sever. Deoarece în această metodă de testare se utilizează testarea de tip ICE pentru a se identifica corozivii sau iritanții severi, martorul control trebuie să fie o substanță de referință care provoacă un răspuns sever în cadrul acestei metode de testare. Totuși, pentru a fi posibilă evaluarea variabilității răspunsului martorului pozitiv în funcție de timp, dimensiunea răspunsului sever nu trebuie să fie excesiv de mare. Este necesar să fie generate suficiente date *in vitro* pentru martorul pozitiv, astfel încât să poată fi calculat un interval statistic acceptabil pentru acesta. Dacă nu sunt disponibile date adecvate precedente privind metoda de testare ICE pentru un anumit martor pozitiv, pot fi necesare studii pentru obținerea acestora.
33. Acidul acetic 10 % sau clorura de benalconiu 5 % sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțele de test lichide, iar hidroxidul de sodiu sau imidazolul sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțe de testare solide.
34. Substanțele etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei clase de substanțe sau de produse, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

**Caracteristici măsurate**

35. Corneele tratate sunt evaluate înainte tratamentului și la 30, 75, 120, 180, și 240 minute ( $\pm 5$  minute) după spălarea post-tratament. Aceste momente de observare permit un număr adecvat de măsurători pe parcursul celor patru ore de tratament, lăsând un interval suficient între măsurători pentru efectuarea observațiilor necesare la nivelul tuturor ochilor.
36. Caracteristicile evaluate sunt opacitatea corneană, inflamarea, retenția de fluoresceină și efectele morfologice (de exemplu, corodarea sau detașarea epitelului). Cu excepția retenției de fluoresceină (determinată numai înainte de tratament și la 30 de minute după expunerea la substanța de test), toate caracteristicile se determină în fiecare din momentele de observare menționate mai sus.
37. Se recomandă realizarea de fotografii pentru documentarea privind opacitatea corneană, retenția de fluoresceină, efectele morfologice și, dacă s-au efectuat, studiile histopatologice.
38. După examinarea finală la un interval de patru ore, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii într-un fixator adecvat (de exemplu, formol neutru tamponat), pentru o potențială investigare histopatologică.

▼ **M2**

39. Inflamarea corneană se determină prin măsurarea grosimii corneene efectuată cu ajutorul unui pahimetru optic, atașat unui microscop oftalmologic. Aceasta se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor grosimii corneene conform formulei următoare:

$$\left[ \frac{\text{grosimea corneana la momentul } t - \text{grosimea corneana la momentul } = 0}{\text{grosimea corneana la momentul } = 0} \right] \times 100$$

40. Valoarea procentuală medie a inflamării corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului maxim mediu al inflamării corneene, obținut în oricare din momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță de test.
41. Opacitatea corneană se calculează prin utilizarea pentru înregistrare a suprafeței corneei care este cea mai opacifiată. Valoarea medie a opacității corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului mediu maxim al opacității corneene obținut în oricare din momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță de test (Tabelul 1).

Tabelul 1

Punctajele opacității corneene

| Punctaj | Observații   |
|---------|--|
| 0       | Absența opacității   |
| 0,5     | Opacitate redusă   |
| 1       | Zone dispersate sau difuze; detaliile irisului sunt vizibile în mod clar   |
| 2       | Zone translucide ușor sesizabile; detaliile irisului sunt ușor neclare   |
| 3       | Opacitate corneană severă; nu sunt vizibile anumite detalii ale irisului; dimensiunea pupilei este foarte puțin sesizabilă |
| 4       | Opacitate corneană completă; iris invizibil  |

42. Valoarea medie a retenției de fluoresceină pentru toți ochii testați se calculează numai pentru momentul de observare după 30 de minute, care este utilizat pentru punctajul general al categoriei furnizat pentru fiecare substanță de test (Tabelul 2).

Tabelul 2

Punctajele de retenție a fluoresceinei

| Punctaj | Observații  |
|---------|---|
| 0       | Absența retenției de fluoresceină                                   |
| 0,5     | Colorare redusă a unor celule izolate                               |
| 1       | Colorare a unor celule izolate dispersate pe zona tratată a corneei |
| 2       | Colorare intensă focalizată sau confluentă a unor celule izolate    |
| 3       | Zone confluențe întinse ale corneei care rețin fluoresceina         |

## ▼ M2

43. Efectele morfologice includ „corodarea” celulelor epiteliale corneene, „detașarea” epiteliului, „formarea de asperități” la nivelul suprafeței corneene și „aderarea” de cornee a substanței de test. Aceste rezultate pot varia în gravitate și pot exista simultan. Clasificarea rezultatelor este subiectivă în funcție de interpretarea formulată de cercetător.

## DATE ȘI RAPORTARE

## Evaluarea datelor

44. Rezultatele pentru opacitatea corneană, inflamarea corneei și reținerea fluoresceinei trebuie evaluate separat pentru a genera o clasă ICE pentru fiecare caracteristică. Clasele ICE pentru fiecare caracteristică sunt combinate ulterior pentru a genera o clasificare a potențialului iritant pentru fiecare substanță de test.

## Criterii de decizie

45. După evaluarea fiecărei caracteristici, se pot desemna clasele ICE în funcție de un interval predeterminat. Interpretarea grosimii corneene (Tabelul 3), a opacității (Tabelul 4), și a retenției de fluoresceină (Tabelul 4) care utilizează patru clase ICE este realizată în conformitate cu următoarele scale:

Tabelul 3

Criteriile de clasificare a ICE pentru grosimea corneană

| Inflamarea corneană medie (%) (*)         | Clasa ICE |
|---|-----------|
| 0 până la 5                               | I         |
| > 5 până la 12                            | II        |
| > 12 până la 18 (> 75 min după tratament) | II        |
| > 12 până la 18 (≤ 75 min după tratament) | III       |
| > 18 până la 26                           | III       |
| > 26 până la 32 (> 75 min după tratament) | III       |
| > 26 până la 32 (≤ 75 min după tratament) | IV        |
| > 32                                      | IV        |

(\*) Punctajele pentru inflamarea corneană sunt aplicabile numai dacă grosimea se măsoară cu un microscop oftalmologic Haag-Streit BP900 cu dispozitivul de măsurare a adâncimii nr. I și cu lărgimea fantei setată la 9½, respectiv egală cu 0,095 mm. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscopul oftalmologic poate produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită.

Tabelul 4

Criteriile de clasificare a ICE pentru opacitate

| Punctajul maxim mediu pentru opacitate (*) | Clasa ICE |
|--|-----------|
| 0,0-0,5                                    | I         |
| 0,6-1,5                                    | II        |
| 1,6-2,5                                    | III       |
| 2,6-4,0                                    | IV        |

(\*) Vezi tabelul 1.



## ▼ M2

Tabelul 5

Criteriile de clasificare a ICE pentru retenția de fluoresceină

| Punctajul mediu al retenției de fluoresceină la 30 de minute post-tratament (*) | Clasa ICE |
|---|-----------|
| 0,0-0,5   | I         |
| 0,6-1,5   | II        |
| 1,6-2,5   | III       |
| 2,6-3,0   | IV        |

(\*) Vezi tabelul 2.

46. Clasificarea generală a potențialului iritant *in vitro* pentru o substanță de test este stabilită prin interpretarea clasificării potențialului iritant care corespunde combinării categoriilor obținute pentru inflamarea corneană, opacitatea corneană și retenția de fluoresceină, precum și prin aplicarea schemei prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6

Clasificări generale ale potențialului iritant *in vitro*

| Clasificare           | Combinații ale celor 3 caracteristici  |
|-----------------------|--|
| Coroziv/Iritant sever | $3 \times \text{IV}$<br>$2 \times \text{IV}, 1 \times \text{III}$<br>$2 \times \text{IV}, 1 \times \text{II} (*)$<br>$2 \times \text{IV}, 1 \times \text{I} (*)$<br>Opacitatea corneană $\geq 3$ la 30 min (pentru cel puțin 2 ochi)<br>Opacitatea corneană = 4 în orice moment (pentru cel puțin 2 ochi)<br>Detașarea severă a epitelului (pentru cel puțin 1 ochi) |

(\*) Combinații a căror probabilitate de apariție este mai mică.

47. Astfel cum s-a arătat la punctul 1, dacă substanța de test nu este identificată drept substanță cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, trebuie efectuate testări suplimentare în scopul clasificării și etichetării. Metoda de testare ICE are o precizie totală cuprinsă între 83 % (120/144) și 87 % (134/154), o rată de rezultate fals pozitive între 6 % (7/122) și 8 % (9/116) și o rată de rezultate fals negative de 41 % (13/32) până la 50 % (15/30) pentru identificarea substanțelor cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, prin comparație cu datele metodei de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemelor de clasificare EPA (1), EU (2), sau GHS (3). Atunci când din baza de date sunt excluse substanțe din anumite clase chimice (și anume, alcoolii și agenți tensioactivi) și fizice (și anume, substanțe solide), precizia metodei ICE raportată la sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este cuprinsă între 91 % (75/82) și 92 % (69/75), rata de rezultate fals pozitive este cuprinsă între 5 % (4/73) și 6 % (4/70), iar rata de rezultate fals negative este cuprinsă între 29 % (2/7) și 33 % (3/9) (4).
48. Chiar dacă pentru o substanță de test nu se obține încadrarea în clasa substanțelor având caracter coroziv sau potențial iritant sever, datele ICE pot fi utile în combinație cu datele de testare obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure sau printr-o testare *in vitro* validată în mod corespunzător, pentru a evalua în continuare utilitatea și limitele de aplicare ale metodei de testare ICE în ceea ce privește identificarea substanțelor având un potențial iritant redus și a celor neiritante (sunt în curs de elaborare linii directe privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare).

**▼ M2****Criterii de acceptare a studiului**

49. Un test este considerat acceptabil dacă martorul negativ sau grupul martor solvent/eluent și martorii pozitivi testați în paralel conduc la o clasificare a caracterului iritant care încadrează în clasa substanțelor neiritante și, respectiv, în clasa substanțelor având potențial iritant sever/coroziv.

**Raport de testare**

50. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

*Substanțe testate și de control*

Denumire (denumiri) chimică (chimice), precum denumirea structurală utilizată de *Chemical Abstracts Service* (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

Numărul de înregistrare (*Registry Number* -RN) CAS, dacă se cunoaște;

Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) de greutate], în măsura în care informația respectivă este disponibilă;

Proprietăți fizico-chimice, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;

Tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

Stabilitate, dacă este cunoscută.

*Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare*

Numele și adresa sponsorului, a instalației de testare și a directorului de studiu;

Identificarea sursei ochilor (de exemplu, întreprinderea unde au fost colectați);

Condițiile de depozitare și transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp până la începerea testării);

Dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, vârsta, sexul, greutatea animalului donator).

*Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat**Integritatea metodei de testare*

Procedura utilizată pentru a asigura integritatea în timp (și anume, precizia și fiabilitatea) a metodei de testare (de exemplu, testarea periodică a substanțelor de verificare, utilizarea datelor istorice de control negative și pozitive).

*Criteriile pentru un test acceptabil*

După caz, intervale pentru martorii etalon acceptabili testați în paralel pe baza datelor istorice.

*Condiții de testare*

Descrierea sistemului de testare utilizat;

Microscopul oftalmologic utilizat (de exemplu, modelul);

Reglajele instrumentelor pentru microscopul oftalmologic utilizat;

Informații privind ochii de pui utilizați, inclusiv specificații privind calitatea acestora;

▼ **M2**

Detalii privind procedura de testare utilizată,

Concentrația (concentrațiile) substanței de test utilizate;

Descrierea tuturor modificărilor procedurii de testare;

Trimiteri la datele istorice ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de verificare, substanțe etalon);

Descrierea criteriilor de evaluare folosite;

#### *Rezultate*

Descrierea altor efecte observate;

După caz, fotografii ale ochiului;

#### *Discutarea rezultatelor*

#### *Concluzie*

#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006. JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

(3) United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Disponibil la:

[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Document disponibil la adresa:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Document disponibil la adresa:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

(6) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Document disponibil la adresa:

[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)]

▼ **M2**

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Document disponibil la adresa:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)]

- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Document disponibil la adresa:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)]

- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

- (11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Document disponibil la adresa:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Document disponibil la adresa:

[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].

- (16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

- (17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.* 19, 471-480.

**▼ M2**

- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Document disponibil la adresa:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

- (19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Document disponibil la adresa:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

▼ **M2***Apendicele 1***DEFINIȚII**

**Precizie:** Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

**Substanță etalon:** O substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efectele cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

**Corneea:** Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

**Opacitate corneeană:** Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță de test. Opacitatea corneeană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei.

**Inflamare corneeană:** O măsurare obiectivă în testul ICE a gradului de dilatare a corneei după expunerea la o substanță de test. Se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurărilor nivelului de bază al grosimii corneene (pre-doză) și ale grosimii înregistrate la intervale regulate după expunere la materialul testat prin testul ICE. Gradul de inflamare corneeană este un indicator al unei leziuni a corneei.

**Categoria EPA 1:** Caracter coroziv (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau afectare a corneei sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (1).

**Categoria UE R41:** Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (2).

**Rată de rezultate fals negative:** Proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

**Rată de rezultate fals pozitive:** Proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

**Retenție de fluoresceină:** O măsurare subiectivă în cadrul testului ICE a gradului în care fluoresceina de sodiu este reținută de celulele epiteliale din corneea după expunerea la o substanță de test. Gradul de retenție a fluoresceinei este un indicator al unei leziuni la nivelul epiteliului corneean.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice):** Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de riscuri fizice, riscuri pentru sănătate și riscuri pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, fraze de pericol, fraze de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protecției populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (3).

▼ **M2**

**Categoria HS 1:** Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (3).

**Risc:** Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, sistem sau (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

**Martor negativ:** O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța de test și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul testat.

**Substanță neiritantă:** Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III, în categoriile UE R41 sau R36; sau în categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari (1)(2)(3).

**Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular:** (a) Substanță care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

**Iritant ocular:** (a) Substanță care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria EPA II sau III, categoria UE R36 sau categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari (1)(2)(3).

**Substanță cu potențial iritant sever:** (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este reversibilă după 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

**Controlul pozitiv:** O probă replică conținând toate componentele sistemului testat și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

**Fiabilitate:** Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

**Microscop oftalmologic:** Instrument utilizat pentru a examina direct ochiul, sub puterea de mărire a unui microscop binocular, prin crearea unei imagini stereoscopice, drepte. În cazul metodei de testare ICE, acest instrument este utilizat pentru a vizualiza structurile anterioare ale ochiului de pui și pentru a măsura în mod obiectiv grosimea corneană cu ajutorul unui dispozitiv atașat de măsurare a grosimii.

**Martor solvent/eluent:** O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau eluentul, care este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța de test dizolvată în același solvent sau eluent. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau eluentul interacționează cu sistemul testat.

**▼ M2**

**Testare secvențială:** O strategie de testare în trepte în cadrul căreia sunt revizuite toate informațiile existente privind o substanță de test, într-o anumită ordine, utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se execută o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate face o clasificare lipsită de echivoc.

**Metodă de testare validată:** Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv precizia) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

**Forța probantă:** Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a ajunge la o concluzie în ceea ce privește riscul potențial al unei substanțe și a susține concluzia respectivă.



## ▼ M2

## Apendicele 2

## SUBSTANȚELE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE ICE

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, este posibil ca laboratoarele să dorească să își demonstreze performanțele tehnice prin identificarea corectă a clasificării caracterului coroziv pentru cele 10 substanțe recomandate în tabelul 1. Aceste substanțe au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru iritația/coroziunea locală la nivelul ochilor, care se bazează pe rezultatele testului *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) (și anume, categoriile 1, 2A, 2B, sau neclasificat și etichetat în conformitate cu GHS al Națiunilor Unite) (3) (7). Totuși, ținând cont de utilitatea validată a acestor analize (și anume, în scopul de a identifica numai substanțele care au caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile comercial, să fie disponibile informații de referință *in vivo* de calitate superioară și să existe date de calitate furnizate de două metode *in vitro* pentru indicațiile orientative de testare care se elaborează. Din acest motiv, substanțele iritante au fost selectate din lista recomandată a ICCVAM care cuprinde 122 substanțe de referință pentru validarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare (a se vedea Apendicele H: Lista substanțelor de referință recomandate ICCVAM) (4). Informațiile de referință sunt disponibile în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metodele de testare BCOP și ICE (18) (19).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda ICE

| Substanță                     | CAS RN    | Clasă chimică <sup>(1)</sup> | Formă fizică | Clasificare <i>in vivo</i> <sup>(2)</sup> | Clasificare <i>in vitro</i> <sup>(3)</sup> |
|-------------------------------|-----------|------------------------------|--------------|---|--|
| Clorură de benzalconiu (5 %)  | 8001-54-5 | Compus de tip onium          | Lichid       | Categoria 1                               | Coroziv/Iritant sever                      |
| Clorhexidină                  | 55-56-1   | Amină, amidină               | Solid        | Categoria 1                               | Coroziv/Iritant sever                      |
| Acid dibenzoil-L-tartric      | 2743-38-6 | Acid carboxilic, ester       | Solid        | Categoria 1                               | Coroziv/Iritant sever                      |
| Imidazol                      | 288-32-4  | Heterociclu                  | Solid        | Categoria 1                               | Coroziv/Iritant sever                      |
| Acid tricloracetic (30 %)     | 76-03-9   | Acid carboxilic              | Lichid       | Categoria 1                               | Coroziv/Iritant sever                      |
| Clorură de 2,6-diclor-benzoil | 4659-45-4 | Halogenură de acil           | Lichid       | Categoria 2A                              | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |
| Etil-2-metil-acetoacetat      | 609-14-3  | Cetonă, ester                | Lichid       | Categoria 2B                              | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |
| Azotat de amoniu              | 6484-52-2 | Sare anorganică              | Solid        | Categoria 2A                              | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |

▼ **M2**

| Substanță | CAS RN   | Clasă chimică <sup>(1)</sup> | Formă fizică | Clasificare <i>in vivo</i> <sup>(2)</sup> | Clasificare <i>in vitro</i> <sup>(3)</sup> |
|-----------|----------|------------------------------|--------------|---|--|
| Glicerol  | 56-81-5  | Alcool                       | Lichid       | Neetichetat                               | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |
| n-Hexan   | 110-54-3 | Hidrocarbură (aciclică)      | Lichid       | Neetichetat                               | Necoroziv/Fără potențial iritant sever     |

Prescurtări: Nr. CASRN = Număr de înregistrare al *Chemical Abstracts Service*.

<sup>(1)</sup> Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță de test prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(2)</sup> Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS a Națiunilor Unite (3) (7).

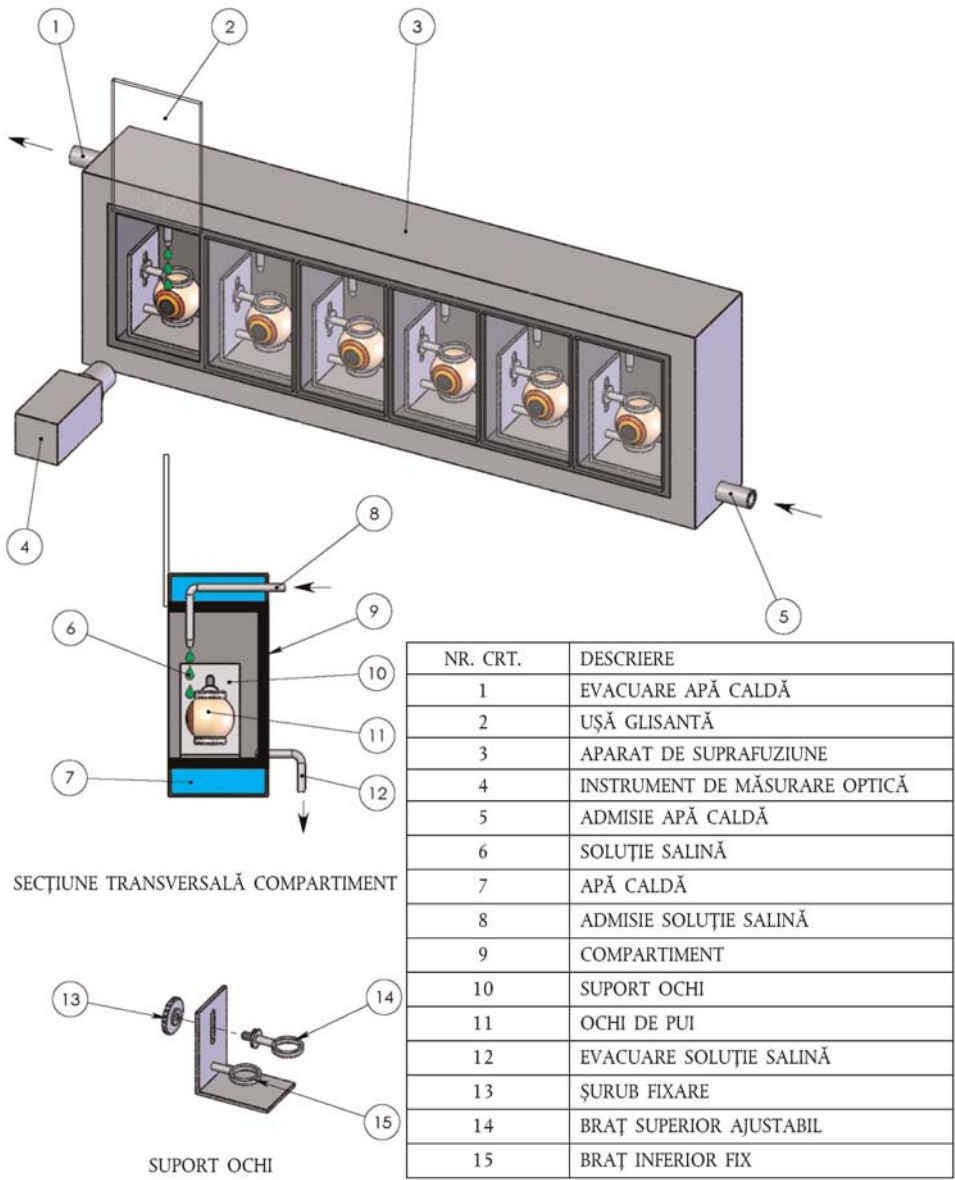
<sup>(3)</sup> Pe baza rezultatelor obținute prin analizele BCOP și ICE.

▼ **M2**

Apendicele 3

**Scheme ale aparatului de suprafuziune ICE și ale clemelor pentru ochi**

[A se vedea Burton et al. (17) pentru descrieri generice suplimentare ale aparatului de suprafuziune și ale clemelor pentru ochi]



## ▼ M3

B.49. TESTUL *IN VITRO* DE MICRONUCLEE PE CELULE DE MAMIFERE

## INTRODUCERE

1. Testul *in vitro* de micronuclee (MNvit) este un test de genotoxicitate pentru identificarea micronucleelor (MN) în citoplasma celulelor în interfază. Micronucleele pot avea ca origine fragmente de cromozomi acentrici (și anume, fără centrometru) sau cromozomi integrali incapabili să migreze către polii celulei în timpul etapei de anafază a divizării celulare. Testul detectează activitatea substanțelor chimice clastogene și aneugene (substanțe și amestecuri) (1) (2) în celulele care au efectuat diviziune celulară în timpul sau după expunerea la substanța de test. Această metodă de testare (MT) autorizează utilizarea de protocoale incluzând sau nu citoclasina B (citoB), un inhibitor de polimerizare a actinei. Adăugarea de citoB anterior mitozei vizate permite identificarea și analiza selectivă a frecvenței micronucleelor în celulele care au încheiat procesul de mitoză, aceste celule fiind binucleate (3) (4). Prezența MT autorizează, de asemenea, utilizarea de protocoale fără blocarea citocinezei, cu condiția existenței posibilității de a demonstra faptul că populația celulară analizată a efectuat mitoză.
2. Pe lângă faptul că permite identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care induc formarea de micronuclee, testul MNvit, asociat blocajului citocinezei, marcării imunochimice a kinetocorilor sau hibridizării cu sonde centrometrice/telometrice [hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH)], poate de asemenea, să furnizeze informații cu privire la mecanismele care stau la originea leziunilor cromozomiale și a formării micronucleelor (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Aceste proceduri de marcăre și de hibridizare pot fi utilizate atunci când se constată o creștere a formării de micronuclee, iar experimentatorul dorește să stabilească dacă respectiva creștere este rezultatul unor evenimente clastogenice și/sau aneugene.
3. Micronucleele reprezintă leziunile transmise celulelor-fiice, în timp ce aberațiile cromozomiale observate în celulele aflate în metafază pot să nu fie transmise. Deoarece micronucleele prezente în celulele în interfază pot fi evaluate în mod relativ obiectiv, personalul laboratorului trebuie doar să determine dacă celulele au efectuat mitoză și să identifice numărul de celule care conțin un micronucleu. Prin urmare, preparatele pot fi examinate relativ rapid, iar analiza poate fi automatizată. Acest lucru permite numărarea a mii în loc de sute de celule pentru fiecare tratament, mărind astfel puterea testului. În sfârșit, dat fiind faptul că micronucleele pot să provină de la cromozomi întârziați, testul poate permite detectarea agenților de inducție aneuploidică, dificil de studiat în cadrul testelor de aberații cromozomiale clasice, de exemplu orientarea OCDE de testare nr. 473 (capitolul B.10 din prezenta anexă) (17). Cu toate acestea, testul MNvit nu permite diferențierea substanțelor chimice care induc poliploidie de cele care induc clastogenicitate fără utilizarea de tehnici speciale precum metoda FISH descrisă la punctul 2.
4. Testul MNvit este o metodă *in vitro* care utilizează în general culturi de celule umane sau de la rozătoare. Acesta constituie un instrument de bază complet pentru investigarea *in vitro* a potențialului de leziuni cromozomiale datorită capacității acestuia de evidențiere a agenților aneugeni și clastogeni.
5. Testul MNvit este fiabil și eficient pe o diversitate de tipuri de celule în prezența sau absența citoB. Validitatea testului MNvit este atestată de numeroase date obținute utilizându-se diferite linii celulare provenite de la rozătoare (CHO, V79, CHL/IU și L5178Y) și limfocite umane (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Acestea includ, în special, studii internaționale de validare coordonate de *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) și rapoartele

## ▼ M3

elaborate de *International Workshop on Genotoxicity Testing* (4) (16). În plus, datele disponibile au făcut obiectul unei noi evaluări în cadrul unui studiu de validare retrospectiv fondat pe forța probatorie a datelor, efectuat de Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) al Comisiei Europene, iar metoda de testare a fost declarată valabilă din punct de vedere științific de către Comitetul științific consultativ al ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Utilizarea unei linii celulare limfoblastoide umane TK6 (35), de celule HepG2 (36) (37) și de celule embrionare primare de hamster sirian (38) a fost descrisă, fără a fi însă utilizată în studiile de validare.

## DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Testele efectuate *in vitro* necesită, în general, o sursă exogenă de activare metabolică, cu excepția cazului în care celulele utilizate sunt compatibile din punct de vedere metabolic cu substanțele testate. Sistemele de activare metabolică de acest tip nu reproduc integral condițiile *in vivo*. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar conduce la rezultate pozitive false care nu reflectă mutagenitatea intrinsecă și care pot proveni de la factori precum modificările importante de pH, de osmolalitate sau din valori mari ale citotoxicității (39) (40) (41). În cazul în care substanța de test cauzează o modificare a pH-ului mediului în timpul adăugării sale, pH-ul trebuie ajustat, de preferat tamponând soluția-mamă astfel încât toate volumele să rămână identice pentru toate concentrațiile testate și pentru toate substanțele martor.
8. Pentru a analiza inducția micronucleelor, este esențial ca mitoza să se fi produs atât în culturile tratate, cât și la cele netratate. Cea mai prolifică etapă în materie de date în ceea ce privește numărarea micronucleelor este în celulele care au finalizat o mitoză în timpul sau după tratamentul cu substanța de test.

## PRINCIPIUL TESTULUI

9. Culturile celulare de origine umană sau mamiferă sunt expuse la substanța de test în prezența și în absența unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care sunt utilizate celule dotate cu capacitate metabolică adecvată. Toate testele includ utilizarea concomitentă de solvenți/vehiculi (VC) și substanțe chimice martor pozitive (PC).
10. În timpul sau după expunerea la substanța de test, celulele se plasează în culturi pentru o perioadă suficientă pentru a permite leziunii cromozomiale sau a fuzului să conducă la formarea de micronuclee în celulele aflate în interfază. Pentru inducția aneuploidiei, substanța de test trebuie în general să fie prezentă în timpul producerii mitozei. Celulele recoltate în interfază sunt colorate și analizate pentru a detecta prezența micronucleelor. În principiu, numărarea micronucleelor trebuie realizată în celulele care au efectuat o mitoză completă în timpul expunerii la substanța de test sau în timpul perioadei de post-expunere, dacă aceasta este prevăzută în cadrul testului. În culturile care au fost tratate cu un agent de blocare a citocinezei, numărarea se efectuează doar pe celulele binucleate. În absența unui agent de blocare a citocinezei, este important să se demonstreze că celulele analizate au efectuat cel mai probabil diviziunea celulară în timpul sau după expunerea la substanța de test. Pentru toate protocoalele, este important să se demonstreze că proliferarea celulară a avut loc atât în culturile tratate, cât și în cele martor, iar gradul de citotoxicitate sau citostază indus de substanța de test este evaluat pentru toate culturile (sau culturile paralele) în care se realizează numărarea micronucleelor.

## ▼ M3

## DESCRIEREA TESTULUI

*Pregătiri*

11. În cadrul testului pot fi utilizate limfocite primare din sânge periferic uman în cultură (5) (19) (42) (43) și mai multe linii celulare provenite de la rozătoare precum CHO, V79, CHL/IU, și L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Utilizarea de alte linii celulare sau alte tipuri de celule trebuie justificată pe baza performanței demonstrate a acestora în cadrul testului, astfel cum este indicat în secțiunea referitoare la criteriile de acceptabilitate. Deoarece frecvența obișnuită a micronucleelor va influența sensibilitatea testului, se recomandă utilizarea unor tipuri de celule cu o frecvență obișnuită de formare a nucleelor slabă și stabilă.
12. Limfocitele din sângele periferic uman utilizate sunt obținute de la persoane tinere (aproximativ 18-35 de ani), sănătoase, nefumătoare, fără expuneri recente cunoscute la substanțe chimice sau radiații genotoxice. Dacă celulele provenite de la mai mulți donatori sunt puse în comun în vederea utilizării, trebuie precizat numărul de donatori. Frecvența micronucleelor crește odată cu vârsta, iar această tendință este mai marcantă la femei decât la bărbați (44), aspect care trebuie luat în considerare în momentul selectării donatorilor pentru o punere în comun a celulelor.

*Medii și condiții de cultură*

13. Trebuie utilizate un mediu de cultură și condiții de incubare (recipiente de cultură, concentrație de CO<sub>2</sub>, temperatură și umiditate) adecvate pentru menținerea culturilor. Liniile celulare stabilite și sușele celulare trebuie verificate regulat pentru a verifica stabilitatea cariotipului și absența contaminării cu micoplasme și nu trebuie utilizate dacă au fost contaminate sau în cazul în care cariotipul s-a modificat. Durata normală a ciclului celular în condiții de cultură aplicate într-un laborator de testare trebuie cunoscută. În cazul în care se utilizează metoda de blocare a citocinezei, concentrația agentului inhibitor al citocinezei se adaptează la tipul de celulă utilizat și s-a dovedit capacitatea acestuia de a produce suficiente celule binucleate pentru a se putea proceda la numărarea acestora.

*Pregătirea culturilor*

14. Liniile celulare stabilite și sușe celulare: celulele sunt multiplicare plecând de la culturile-mamă, plasate într-un mediu de cultură la o densitate astfel încât culturile să nu acopere complet suprafața mediului, iar culturile în suspensie să nu atingă o densitate excesivă înainte de recoltarea acestora, și sunt incubate la 37 °C.
15. Limfocite: sânge integral tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină) sau limfocite separate sunt plasate în cultură în prezența unui mitogen, de exemplu fitehemaglutinină (PHA), anterior expunerii la substanța de test sau la citoB.

*Activare metabolică*

16. Recurgerea la un sistem de activare metabolică exogen este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate metabolică endogenă inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent este o fracție postmitochondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (45) (46) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (46) (47) (48) (49). Utilizarea acestui amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (50) și nici Regulamentului (CE) nr. 850/2004 privind poluanții organici persistenți (66) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca și Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (46) (47) (48) (49). Frația S9 este în general utilizată cu o concentrație cuprinsă între 1-10 % (v/v) în mediul de test final. Alegerea unui sistem de activare metabolică poate depinde de clasa substanței chimice, iar în unele cazuri poate fi mai adecvată utilizarea mai multor concentrații ale fracției S9.

▼ **M3**

17. Liniile celulare modificate genetic pentru a produce enzime de activare specifice, umane sau de rozătoare, pot elimina necesitatea utilizării unui sistem de activare metabolică exogen și pot fi utilizate ca celule de test. În astfel de cazuri, alegerea liniilor celulare utilizate trebuie justificată științific, de exemplu prin relevanța oxidazelor cu funcție mixtă pentru metabolismul substanței de test (51) și reactivitatea acestora la substanțele clastogene și aneugene cunoscute (a se vedea secțiunea separată referitoare la criteriile de acceptabilitate). Trebuie recunoscut faptul că substanța testată poate să nu fie metabolizată de oxidaza (oxidazele) cu funcție mixtă exprimate; în acest caz, rezultatele negative nu ar indica faptul că substanța de test nu poate induce micronuclee.

## Prepararea substanței de test

18. Substanțele chimice solide sunt dizolvate într-un vehicul sau în solvenți adecvați și diluate, dacă este cazul, anterior tratamentului aplicat celulelor. Substanțele chimice lichide pot fi adăugate direct sistemelor de testare și/sau diluate înaintea tratamentului. Gazele sau substanțele volatile necesită o modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de recipiente închise ermetic (52) (53). Trebuie utilizate preparate proaspete ale substanței de test, cu excepția cazului când datele reținute demonstrează stabilitatea preparatelor în condiții de stocare.

*Condiții de testare*

## Solvenți/vehicul

19. Solventul/vehiculul nu trebuie să reacționeze cu substanța de test și nici să altereze supraviețuirea celulelor sau menținerea activității S9 la concentrația utilizată. Dacă sunt utilizați alți solvenți/vehicule decât cei bine stabiliți (de exemplu, apă, mediu de cultură celulară, dimetilsulfoxid), utilizarea acestora trebuie justificată prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanța de test, precum și absența genotoxicității. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent/vehicul apos.

## Utilizarea de citoB ca agent de blocare a citocinezei

20. Unul dintre cele mai importante aspecte în efectuarea testului MNvit este garantarea faptului că celulele numărate au încheiat mitoza în timpul tratamentului sau în timpul perioadei de incubare posttratament, dacă aceasta este prevăzută în cadrul metodei. CitoB este agentul folosit cel mai frecvent pentru blocarea citocinezei, deoarece inhibă asamblarea actinei împiedicând astfel separarea celulelor-fiice după mitoza, conducând la formarea de celule binucleate (5) (54) (55). Prin urmare, numărarea micronucleelor poate fi limitată la celulele care au fost supuse procesului de mitoza în timpul sau după tratament. Efectul substanței de test asupra cineticii proliferării celulare poate fi măsurat concomitent. CitoB trebuie utilizat ca agent de blocare a citocinezei atunci când sunt utilizate limfocite umane, deoarece durata ciclului celular este variabilă în funcție de culturi și donatori și pentru că nu toate limfocitele reacționează la PHA. Au fost utilizate și alte metode pentru a determina dacă celulele liniilor celulare utilizate și care fac obiectul unei numerotări au efectuat o mitoza; metodele respective sunt detaliate mai jos (a se vedea punctul 26).
21. Pentru fiecare tip de celulă, laboratorul determină concentrația adecvată de citoB pentru a obține frecvența optimală de celule binucleate în culturile martor tratate cu solvent/vehicul. Concentrația adecvată de citoB este, în general, cuprinsă între 3 și 6 μg/ml.

## ▼ M3

Măsurarea proliferării celulare și a citotoxicității și alegerea concentrațiilor de expunere

22. În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței de test, trebuie evitate concentrațiile susceptibile să producă false răspunsuri pozitive, precum cele care produc citotoxicitate excesivă, un precipitat în mediul de cultură și modificări importante de pH sau osmolalitate (39) (40) (41).
23. Măsurătorile proliferării celulare se efectuează pentru a asigura că celulele tratate au efectuat o mitoză în timpul testului și că tratamentele sunt realizate la niveluri adecvate de citotoxicitate (a se vedea punctul 29). Citotoxicitatea se determină cu sau fără activare metabolică în celulele care nu necesită activare metabolică cu ajutorul creșterii relative a numărului de celule (RICC) sau dublarea relativă a populației (RPD) (a se vedea formulele din apendicele 2) cu excepția situației când se utilizează citoB, caz în care citotoxicitatea poate fi determinată cu ajutorul indicelui de replicare (IR) (a se vedea formulele din apendicele 2).
24. Tratarea culturilor cu citoB și măsurarea frecvențelor relative ale celulelor mononucleate, binucleate și multinucleate în fiecare cultură furnizează o metodă precisă de cuantificare a efectului unui tratament asupra proliferării celulare și a activității citotoxice sau citostatice (5) și asigură că numai celule care s-au divizat în timpul tratamentului sau după acesta sunt luate în calcul.
25. În studiile cu citoB, citotaza/citotoxicitatea poate fi cuantificată cu ajutorul indicelui de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) (5) (26) (56) sau poate fi derivată din indicele de replicație pornind de la cel puțin 500 de celule pentru fiecare cultură (a se vedea formulele din apendicele 2). Atunci când citoB este utilizată pentru a evalua proliferarea celulară, un CBPI sau RI trebuie determinat având la bază cel puțin 500 de celule pentru fiecare cultură. Aceste măsuri pot servi, printre altele, la estimarea citotoxicității prin compararea valorilor obținute pentru culturile tratate și cele martor. Evaluarea markerilor de citotoxicitate (de exemplu, grad de confluență, număr de celule, apoptoză, necroză, numărare de celule în metafază) pot furniza informații utile.
26. În studiile fără citoB, este necesar să se demonstreze că celulele numărate dintr-o cultură au realizat diviziunea în timpul sau ulterior tratamentului cu substanța de test, în caz contrar existând riscul de producere a unor răspunsuri fals negative. Metodele care au fost utilizate pentru a garanta că celulele divizate sunt cele numărate includ incorporarea și ulterior detectarea bromodeoxiuridinei (BrdU) pentru identificarea celulelor replicate (57), formarea de clone în momentul în care celule provenite de la linii celulare permanente sunt tratate și numărate *in situ* pe o lamă de microscop [indice de proliferare (PI)] (25) (26) (27) (28) sau măsurarea dublării relative a populației (RPD) sau creșterea relativă a numărului de celule (RICC) sau alte metode dovedite (16) (56) (58) (59) (a se vedea formulele din anexa 2). Evaluarea altor markeri de citotoxicitate sau citotază (de exemplu, grad de confluență, număr de celule, apoptoză, necroză, numărare de celule în metafază) poate furniza informații utile.
27. Trebuie evaluate cel puțin trei concentrații analizabile. În acest scop, poate fi necesară efectuarea experimentului cu ajutorul unui număr mai mare de concentrații la distanță apropiată și analizarea formării micronucleelor în concentrațiile care prezintă o plajă de citotoxicități adecvate. O strategie alternativă este reprezentată de realizarea unui test de citotoxicitate preliminar pentru a restrânge spectrul testului definitiv.
28. Cea mai mare concentrație trebuie să vizeze producerea unui nivel de toxicitate  $55 \pm 5\%$ . Niveluri mai mari pot induce leziuni cromozomiale ca efect secundar al citotoxicității (60). În prezența citotoxicității, concentrațiile de test selectate trebuie să acopere un interval cuprins între citotoxicitate zero sau ușoară și o citotoxicitate de  $55 \pm 5\%$ .



## ▼ M3

29. Atunci când nu se observă nicio citotoxicitate sau precipitat, cea mai mare concentrație de test trebuie să corespundă celei mai mici concentrații dintre următoarele: 0,01 M, 5 mg/mL sau 5 μl/mL. Concentrațiile selectate pentru analiză sunt, în general, separate de un factor de maxim 10. Pentru substanțele de test care prezintă o curbă concentrație-răspuns caracterizată de o pantă puternică, poate fi necesară reducerea factorului de separare a concentrațiilor substanței de test astfel încât culturile aflate în plajele de toxicitate inferioare sau medii să fie, de asemenea, analizate.
30. Atunci când solubilitatea este un factor de limitare, concentrația maximă, dacă aceasta nu este limitată de citotoxicitate, corespunde concentrației maxime care permite observarea unei precipitații minime în condiții de cultură, cu condiția ca aceasta să nu interfereze cu numărarea. Evaluarea precipitării trebuie să se facă prin metode precum microscopia optică, notând precipitatul persistent sau care apare în timpul perioadei de cultură (până la sfârșitul tratamentului).

## Martori

31. Martori concomitenți pozitivi și tratați cu solvent/vehicul, cu sau fără activare metabolică, trebuie incluși în fiecare experiment.
32. Martorii pozitivi sunt necesari pentru a demonstra că celulele utilizate și protocolul de testare permit identificarea substanțelor clastogene și aneugene și pentru a dovedi capacitatea metabolică a preparatului S9. Martorii pozitivi trebuie să facă apel la inductori cunoscuți de formare de micronuclee la concentrații susceptibile să determine o creștere ușoară sau reproductibilă a frecvenței de fond și să demonstreze sensibilitatea sistemului de testare. Concentrațiile martorilor pozitivi trebuie alese astfel încât efectele să fie clare, dar să nu dezvăluie imediat identitatea lamelelor codate celui care le interpretează.
33. Un clastogen care necesită activare metabolică (de exemplu, ciclofosamidă; benzo[a]piren) trebuie utilizat pentru a demonstra atât competența metabolică, cât și abilitatea sistemului de testare de detectare a clastogenelor. Alte substanțe martor pozitive pot fi utilizate, dacă acest lucru este justificat. Deoarece unele substanțe martor pozitive care necesită activare metabolică pot fi active fără activare metabolică exogenă în anumite condiții de tratament sau la anumite linii celulare, necesitatea activării metabolice, precum și activitatea preparării S9 trebuie testată pe linia celulară selectată și la concentrațiile selectate.
34. În prezent, niciun aneugen cunoscut nu necesită activare metabolică pentru a prezenta activitate genotoxică (16). Martorii pozitivi acceptați în prezent pentru activitatea aneugenică sunt, de exemplu, colchicina și vinblastina. Pot fi utilizate și alte substanțe chimice dacă acestea induc micronuclee doar sau în principal prin intermediul activității aneugene. Pentru a evita necesitatea a două substanțe martor pozitive (pentru clastogenitate și aneugenitate) fără activare metabolică, martorul pentru aneugenitate poate fi utilizat ca martor pozitiv fără S9, iar martorul pentru clastogenitate poate fi utilizat pentru a testa caracterul adecvat al sistemului de activare metabolică utilizat. Martorii pozitivi atât pentru clastogenitate, cât și pentru aneugenitate se utilizează pentru celulele care nu necesită S9. Martorii pozitivi sugerați sunt indicați în apendicele 3.
35. Utilizarea de substanțe martor pozitive aparținând aceleiași clase chimice poate fi luată în considerare dacă sunt disponibile substanțe chimice adecvate. Toate substanțele martor pozitive trebuie să fie adaptate tipului de celulă în cauză și condițiilor de activare.

## ▼ M3

36. Substanțe martor tratate cu solvent/vehicul trebuie incluse la momentul fiecărei recolte. În plus, substanțe martor negative netratate (fără solvent/vehicul) trebuie, de asemenea, utilizate cu excepția cazului când datele publicate sau obținute în urma testelor martor realizate anterior de către laborator demonstrează că solventul ales nu induce aciune genotoxică sau alte efecte nocive la concentrațiile utilizate.

## PROCEDURA DE TESTARE

*Schema de tratament*

37. Pentru a maximiza probabilitatea detectării unei acțiuni aneugene sau clastogene într-un stadiu specific al ciclului celular, este important ca un număr suficient de celule să fie tratate cu substanța de test în toate stadiile ciclului celular. Schema de tratament pentru liniile celulare și culturile de celule primare poate, prin urmare, să difere într-o oarecare măsură de cea pentru limfocite, care necesită o stimulare mitogenică pentru a demara ciclul celular, și care sunt detaliate la punctele 41-43 (16).
38. Considerațiile teoretice și datele publicate (18) indică faptul că majoritatea substanțelor aneugene și clastogene sunt detectate în urma unui tratament de scurtă durată, de 3 până la 6 ore, în prezența și în absența preparatului S9, urmat de îndepărtarea substanței de test și o perioadă de creștere echivalentă cu 1,5-2,0 cicluri celulare (6). Eșantioanele de celule sunt prelevate după un timp echivalent cu aproximativ 1,5-2,0 ori durata unui ciclu celular normal (și anume netratat) fie după începutul tratamentului, fie la sfârșitul acestuia (a se vedea tabelul 1). Durata eșantionării sau a recuperării poate fi extinsă dacă se cunoaște sau se presupune că substanța de test afectează durata ciclului celular (de exemplu, dacă se testează nucleotide analoage).
39. Din cauza citotoxicității potențiale a preparatelor S9 pentru celulele de mamifere cultivate, tratamentul de expunere prelungită echivalent cu 1,5-2,0 cicluri celulare normale este utilizat doar în absența preparatului S9. În tratamentul extins, sunt posibile diferite opțiuni pentru a permite tratarea celulelor cu substanța de test în absența sau în prezența citoB. Aceste opțiuni vizează situațiile în care pot exista preocupări referitoare la interacțiunile posibile dintre substanța de test și citoB.
40. Tabelul 1 prezintă diferitele scheme de tratament propuse. Schemele de tratament general pot fi modificate în funcție de stabilitatea sau de reactivitatea substanței de test sau de caracteristicile de creștere ale celulelor utilizate. Toate tratamentele trebuie să înceapă și să se încheie în timpul etapei de creștere exponențială a celulelor. Aceste scheme sunt prezentate mai detaliat la punctele 41-47 mai jos.

Tabelul 1

## Tratamentul celulelor și timpii de recoltă pentru testul MNvit

|  |                         |   |
|--|-------------------------|---|
| Limfocite, celule primare și linii celulare tratate cu citoB | + S9                    | Tratare timp de 3-6 ore în prezența S9; înlăturarea S9 și a mediului de tratare; adăugarea unui mediu proaspăt și a citoB; recoltarea după 1,5-2,0 cicluri celulare normale |
|  | - S9<br>Expunere scurtă | Tratare timp de 3-6 ore; înlăturarea mediului de tratare; adăugarea unui mediu proaspăt și a citoB; recoltarea după 1,5-2,0 cicluri celulare normale.                       |

▼ **M3**

|  |  |   |
|--|--|---|
|  | <p>– S9</p> <p>Expunere prelungită</p> | <p><i>Opțiunea A:</i> Tratare timp de 1,5-2 cicluri normale celulare în prezența citoB;<br/>recoltare la sfârșitul perioadei de expunere.</p> <p><i>Opțiunea B:</i> Tratare timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale;<br/>înlăturarea substanței de test;<br/>adăugarea unui mediu proaspăt și a citoB;<br/>recoltarea după 1,5-2,0 cicluri celulare normale.</p> |
|--|--|---|

Linii celulare tratate fără citoB

(schemă de tratament identică cu schemele de tratament descrise mai sus, cu excepția faptului că nu se adaugă citoB)

*Limfocite, celule primare și linii celulare cu citoB*

41. În cazul limfocitelor, cea mai eficientă metodă constă în demararea expunerii la substanța de test la 44-48 de ore după stimularea cu PHA, odată dispărută sincronizarea ciclului celular (5). În timpul testului inițial, celulele sunt tratate timp de 3-6 ore cu substanța de test în absența și în prezența S9. Mediul de tratament este apoi eliminat și înlocuit cu un mediu proaspăt conținând citoB, iar celulele sunt recoltate după 1,5-2,0 cicluri celulare normale.

42. Dacă rezultatele ambelor teste inițiale de tratament scurt (3-6 ore) sunt negative sau echivoce, se utilizează un alt tratament cu o expunere extinsă fără S9. Două opțiuni de tratament, ambele acceptabile, sunt disponibile. Cu toate acestea, ar putea fi mai adecvată utilizarea opțiunii A pentru limfocitele stimulate a căror creștere exponențială poate să intre în declin la 96 de ore după stimulare. De altfel, culturile de celule nu trebuie să acopere în întregime suprafața mediului înainte de eșantionarea finală în cadrul opțiunii B.

— Opțiunea A: Celulele sunt tratate cu substanța de test timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale și recoltate la sfârșitul perioadei de tratament.

— Opțiunea B: Celulele sunt tratate cu substanța de test timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale. Mediul de tratament este înlăturat și înlocuit cu un mediu proaspăt iar celulele sunt recoltate după alte 1,5 -2,0 cicluri celulare normale.

43. Tratamentul celulelor primare și al liniilor celulare este similar cu cel aplicat limfocitelor, cu excepția faptului că stimularea acestora cu PHA timp de 44-48 de ore nu este necesară. Celulele, altele decât limfocitele, trebuie expuse astfel încât, la încheierea studiului, celulele să se afle încă în etapa de creștere exponențială.

*Linii celulare fără citoB*

44. Celulele trebuie tratate timp de 3-6 ore în prezența și în absența S9. Mediul de tratament este înlăturat și înlocuit cu un mediu proaspăt, iar celulele sunt recoltate după 1,5-2,0 cicluri celulare normale.

## ▼M3

45. Dacă rezultatele ambelor teste inițiale de tratament scurt (3-6 ore) sunt negative sau echivoce, se utilizează un alt tratament cu o expunere extinsă (fără S9). Două opțiuni de tratament, ambele acceptabile, sunt disponibile:

— Opțiunea A: Celulele sunt tratate cu substanța de test timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale și recoltate la sfârșitul perioadei de tratament.

— Opțiunea B: Celulele sunt tratate cu substanța de test timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale. Mediul de tratament este înlăturat și înlocuit cu un mediu proaspăt, iar celulele sunt recoltate după alte 1,5-2,0 cicluri celulare normale.

46. În culturile monostrat, pot fi prezente celule mitotice (recunoscute după forma rotundă a acestora și după faptul că se detașează de pe suprafață) la sfârșitul perioadei de tratament de 3-6 ore. Deoarece celulele mitotice se detașează ușor, acestea pot fi pierdute în momentul înlăturării mediului conținând substanța de test. Pentru a evita pierderea de celule în mitoză susceptibile să formeze micronuclee, trebuie acordată o atenție deosebită colectării cu grijă a acestora în momentul spălării culturilor și apoi reintroducerii acestora în culturi la momentul recoltei.

#### *Număr de culturi*

47. Trebuie utilizate culturi duplicate pentru fiecare concentrație a substanței de test, precum și pentru culturile de vehicul/solvent și de martori negativi. În cazul în care rezultatele anterioare de laborator au demonstrat că variația între culturile duplicate este minimă, poate fi utilizată o singură cultură pentru fiecare concentrație. În cazul utilizării de culturi unice, se recomandă analizarea unui număr mai mare de concentrații.

#### *Recoltarea celulelor și pregătirea lamelelor*

48. Fiecare cultură este recoltată și prelucrată separat. Prepararea celulelor poate implica tratament hipotonic, dar această etapă nu este necesară dacă celulele sunt răspândite în mod corespunzător în alt mod. Pot fi folosite diferite tehnici pentru prepararea lamelelor, cu condiția ca preparatele celulare obținute pentru numărare să fie de foarte bună calitate. Citoplasma celulară este conservată pentru a permite detectarea de eventuale nuclee și (în cadrul metodei blocării citocinezei) identificarea fiabilă a celulelor binucleate.

49. Lamelele pot fi colorate prin metode diferite precum Giemsa sau coloranți fluorescenți specifici ai ADN (59). Utilizarea unui colorant specific pentru ADN [de exemplu, portocaliu de acridină (61) sau Hoechst 33258 plus pironină-Y (62)] poate elimina o parte dintre artefactele asociate utilizării unui colorant nespecific al ADN. Anticorpii kinetocori, metoda FISH cu sonde ADN pancentrometrice sau marcarea *in situ* prin amorsare cu ajutorul amorselor pancentrometrice, împreună cu un colorant de contrast al ADN adecvat, pot fi utilizați pentru a identifica conținutul (cromozomi/fragmente cromozomiale) micronucleelor dacă informațiile de ordin mecanic cu privire la formarea acestora prezintă interes (15)(16). Alte metode de diferențiere a efectelor clastogene și aneugene pot fi utilizate, cu condiția ca eficacitatea acestora să fi fost demonstrată.

#### *Analiză*

50. Toate lamelele, inclusiv cele cu solvent/vehicul și cu substanțele martor, trebuie codate individual înainte de analiza la microscop. De asemenea, eșantioanele codate pot fi analizate cu ajutorul unui sistem automat validat de citometrie în flux sau de analiză a imaginilor.

## ▼ M3

51. În culturile tratate cu citoB, frecvența micronucleelor se analizează în cel puțin 2 000 de celule binucleate pe concentrație (cel puțin 1 000 de celule binucleate pe cultură; două culturi pe concentrație). În cazul culturilor unice, trebuie analizate cel puțin 2 000 de celule binucleate pe concentrație din culturile respective. Dacă numărul de celule binucleate disponibile într-o cultură pentru fiecare concentrație este considerabil mai mic de 1 000 sau de 2 000 în cazul culturilor unice și dacă nu este detectată nicio creștere semnificativă a numărului de micronuclee, testul trebuie reluat pe un număr mai mare de celule sau la concentrații mai puțin toxice, în funcție de situație. Se recomandă precauție pentru a nu număra celulele binucleate cu formă neregulată sau ale căror nuclee prezintă o diferență de mărime considerabilă; de asemenea, celulele binucleate nu trebuie confundate cu celulele multinucleate răspândite neuniform. Celulele care conțin mai mult de două nuclee principale nu sunt analizate deoarece frecvența de referință a micronucleelor poate fi mai mare în acest tip de celule (63) (64). Numărarea celulelor mononucleate este acceptabilă dacă substanța de test interferează cu activitatea citoB.
52. Pentru liniile celulare testate fără citoB, micronucleele trebuie analizate pentru cel puțin 2 000 de celule pe concentrație (cel puțin 1 000 de celule pe cultură; două culturi pe concentrație). Dacă se utilizează o singură cultură pe concentrație, sunt examinate cel puțin 2 000 de celule din cultura respectivă.
53. Dacă se utilizează citoB, trebuie determinat un CBPI sau un RI pentru a evalua proliferarea celulară (a se vedea apendicele 2) utilizând cel puțin 500 de celule pe cultură. Atunci când tratamentele sunt efectuate în absența citoB, este esențial să se facă dovada că celulele analizate au făcut obiectul unei proliferări, conform punctelor 24-27.

*Criterii de acceptabilitate*

54. Orice laborator care propune utilizarea testului MNvit descris în prezenta MT trebuie să demonstreze capacitatea sa de a detecta în mod fiabil și precis substanțele chimice a căror activitate aneugică și clastogenă este cunoscută, cu sau fără activare metabolică, precum și a substanțelor chimice negative, utilizând substanțele chimice de referință din apendicele 3. Pentru a atesta capacitatea sa de a efectua corect prezenta MT, laboratorul trebuie să demonstreze că celulele ale căror micronuclee au fost numărate au efectuat o diviziune celulară dacă testul este realizat fără utilizare de citoB.
55. Substanțele chimice din apendicele 3 sunt recomandate pentru utilizare ca substanțe chimice de referință. Pot fi incluse substanțe de substituție sau suplimentare dacă activitatea acestora este cunoscută, dacă induc formarea de micronuclee prin intermediul aceluiași mecanism de acțiune și dacă relevanța acestora este dovedită pentru substanțele de test din cadrul procedurii MNvit. Justificarea poate include un studiu de validare acoperind o mare diversitate de substanțe sau axat pe un spectru mai restrâns, limitat la clasa chimică a substanței de test sau la mecanismul de leziune studiat.
56. Martorii tratați cu solvent/vehicul și culturile netratate prezintă frecvențe reproductibile de micronuclee slabe și coerente (de regulă, 5-25 micronuclee/1 000 de celule pentru tipurile de celule indicate la punctul 11). Alte tipuri de celule pot prezenta plaje de răspuns diferite, care trebuie determinate în momentul validării acestora pentru utilizare în cadrul testului MNvit. Datele provenite de la matorii negativi, solvenți și matorii pozitivi trebuie utilizate pentru a stabili plaje de valori de referință. Aceste valori trebuie utilizate în stabilirea caracterului adecvat al matoriilor pozitivi/negativi concomitenți pentru un experiment.

## ▼ M3

57. În cazul în care sunt propuse modificări minore la protocolul de test (de exemplu, utilizarea de tehnici de numărare automate și nu manuale; utilizarea unui nou tip de celulă), atunci eficacitatea modificărilor trebuie demonstrată pentru ca protocolul modificat să poată fi considerat acceptabil pentru utilizare. Demonstrarea eficienței include demonstrarea faptului că pot fi detectate mecanismele majore de ruptură cromozomială, de pierdere sau de câștig cromozomial și că pot fi obținute rezultate pozitive și negative adecvate pentru clasa de substanțe în cauză sau pentru întreg spectrul de substanțe de test.

## DATE ȘI RAPORTARE

*Tratamentul rezultatelor*

58. Dacă se utilizează tehnica blocării citocinezei, doar frecvențele celulelor binucleate prezentând micronuclee (independent de numărul de micronuclee dintr-o celulă) se utilizează pentru evaluarea inducției de micronuclee. Numărarea celulelor prezentând unul, două sau mai multe micronuclee poate oferi informații utile, dar nu este obligatorie.
59. Trebuie efectuate măsurători paralele de citotoxicitate și/sau citostază pentru toate culturile martor tratate sau tratate cu solvent/vehicul (58). De asemenea, trebuie calculat CBPI sau indicele de replicație (RI) pentru toate culturile tratate și cele martor, pentru a măsura întârzierea ciclului celular în cazul utilizării metodei blocării citocinezei. În absența citoB, trebuie măsurate dublarea relativă a populației (RPD) sau creșterea relativă a numărului de celule (RICC) sau indicele de proliferare (PI) (a se vedea apendicele 2).
60. Datele se indică individual pentru fiecare cultură. În plus, toate datele sunt sintetizate sub formă de tabele.
61. Substanțele chimice care induc micronuclee în testul MNvit pot face aceasta deoarece induc ruptură cromozomială, pierdere cromozomială sau o combinație a celor două. Alte analize utilizând anticorpi antikinetocori, sonde centrometrice *in situ*, sau alte metode permit să se determine dacă mecanismul inducției de micronuclee se datorează activității clastogene și/sau aneugene.

*Evaluarea și interpretarea rezultatelor*

62. Nu există nicio cerință referitoare la verificarea cu ajutorul unor teste suplimentare a răspunsurilor pozitive sau negative clare. Rezultatele echivoce pot fi clarificate prin analiza a încă 1 000 de celule din toate culturile pentru a păstra caracterul orb al testului. Dacă această abordare nu permite obținerea unor rezultate satisfăcătoare, trebuie efectuate teste suplimentare. În cadrul experimentelor suplimentare realizate astfel, se are în vedere modificarea parametrilor studiului pentru a lărgi sau pentru a restrânge condițiile, după caz. Parametrii de studiu care ar putea fi modificați includ spațierea dintre concentrațiile de test, calendarul privind tratamentele și recolta celulelor și/sau condițiile de activare metabolică.
63. Mai multe criterii permit determinarea unui rezultat pozitiv precum o creștere legată de concentrație sau o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a numărului de celule conținând micronuclee. Relevanța biologică a rezultatelor trebuie avută în vedere în primă instanță. Faptul că valorile observate sunt cuprinse sau nu în plaja de valori de referință poate furniza indicii utile în momentul evaluării semnificației biologice a răspunsului. Evaluarea rezultatelor testului se poate sprijini pe metode statistice adecvate (65). Cu toate acestea, rezultatele testelor statistice se evaluează în raport cu relația doză-răspuns. Reproducibilitatea și datele istorice trebuie, de asemenea, luate în considerare.

**▼ M3**

64. Deși majoritatea experimentelor oferă rezultate clare pozitive sau negative, în unele cazuri setul de date nu permite conturarea unei judecăți categorice cu privire la activitatea substanței de test. Rezultatele echivoce sau discutabile pot surveni indiferent de numărul de repetări ale testului.
65. Rezultatele pozitive în cadrul unui test MNvit indică faptul că substanța de test induce rupere sau ruptură cromozomială, în culturile de celule de mamifere. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de test nu induce rupere și/sau câștig sau pierdere cromozomială în culturile de celule de mamifere.

*Raportul de testare*

66. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații, dacă acestea sunt relevante pentru efectuarea studiului:

*Substanța chimică de test:*

- date de identificare, numărul din registrul CAS și numărul CE;
- starea fizică și puritate;
- proprietățile fizice și chimice relevante pentru realizarea studiului;
- reactivitatea substanței de test cu solventul/vehiculul sau mediul de cultură celulară;

*Solvent/vehicul:*

- justificarea alegerii solventului/vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de test în solvent/vehicul;

*Celule:*

- tipul și sursa celulelor utilizate;
- caracterul adecvat al tipului de celulă utilizat;
- absența micoplasmei, dacă este cazul;
- informații privind durata ciclului celular, timpul de dublare sau indicele de proliferare;
- în cazul utilizării de limfocite, sexul, vârsta și numărul donatorilor de sânge, dacă se aplică;
- în cazul utilizării de limfocite, a se preciza dacă este expus sânge total sau limfocite izolate;
- numărul de pasaje, dacă se aplică;
- metode de întreținere a culturilor celulare, dacă se aplică;
- numărul modal de cromozomi;
- durata normală a unui ciclu celular (martor negativ);

*Condiții de testare:*

- identitatea substanței de blocare a citocinezei (de exemplu, citoB), dacă se utilizează, concentrația sa și durata de expunere a celulelor;
- justificarea selectării concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv date privind citotoxicitatea și limitele de solubilitate, dacă acestea sunt disponibile;
- compoziția mediului, concentrația de CO<sub>2</sub>, dacă se aplică;
- concentrațiile substanței de test;

**▼ M3**

- concentrația (și/sau volumul) vehiculului și a substanței de test adăugate;
- temperatura și timpul de incubație;
- durata tratamentului;
- perioada de recoltă după tratament;
- densitatea celulară la momentul însămânțării, dacă se aplică;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- substanțele martor pozitive și negative;
- metodele de preparare a lamelelor și tehnica de colorare utilizată;
- criteriile de identificare a micronucleelor;
- numărul de celule analizate;
- metodele de măsurare a citotoxicității;
- orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate;
- criteriile în funcție de care un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;
- metoda (metodele) de analiză statistică utilizate;
- metode precum utilizarea de anticorpi kinetocori, pentru a determina dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau fragmentați, dacă se aplică;

*Rezultate:*

- măsurarea citotoxicității utilizate, de exemplu CBPI sau RI în cazul metodei de blocare a citocinezei; RICC, RPD sau PI atunci când nu sunt utilizate metode de blocare a citocinezei; alte observații, dacă este cazul, de exemplu gradul de confluență celulară, apoptoză, necroză, numărarea celulelor în metafază, frecvența celulelor binucleate;
- semne de precipitare;
- date privind pH-ul și osmolalitatea mediului de tratament, dacă acestea au fost determinate;
- definiția celulelor acceptabile pentru analiză;
- distribuția celulelor mono-, bi- și multinucleate dacă se utilizează o metodă de blocare a citocinezei;
- numărul de celule cu micronuclee, furnizat separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor, precizându-se dacă acestea provin din celule binucleate sau mononucleate, după caz;
- relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;
- date (concentrații și solvenți) privind substanțele martor negative (solvent/vehicul) și pozitive concomitente;
- date istorice privind substanțele martor negative (solvent/vehicul) și pozitive, inclusiv intervale de valori, medii și devieri standard și intervalul de încredere (de exemplu, 95 %);
- analiză statistică; valorile P, dacă este cazul.

*Discutarea rezultatelor**Concluzii*



## ▼ M3

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.
- (14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

## ▼ M3

- (17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [www.oecd.org/env/testguidelines]
- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.
- (19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.
- (20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.
- (21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senju, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.
- (22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.
- (23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.
- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.
- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

## ▼M3

- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25<sup>th</sup> meeting, 16-17 November 2006, Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponibil la: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B<sub>1</sub> is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328..
- (38) Gibson, D.P., Brauningner, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhailevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

## ▼ M3

- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibil la: [<http://www.pops.int/>]
- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”, *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.

**▼ M3**

- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.
- (66) Regulamentul (CE) Nr. 850/2004 al Parlamentului European și al Consiliului din 29 aprilie 2004 privind poluanții organici persistenți și de modificare a Directivei 79/117/CEE, JO L 229, 30.4.2004, p. 5.

▼ **M3***Apendicele 1***Definiții**

*Aneugen*: orice substanță sau proces care, prin interacțiunile cu componentele celulei mitotice sau meiotice în timpul diviziunii celulare, conduce la apariția aneuploidiei în celule sau organisme.

*Aneuploidie*: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

*Apoptoză*: moarte celulară programată caracterizată printr-o succesiune de etape conducând la dezintegrarea celulelor în particule membranare care sunt apoi eliminate prin fagocitoză sau excreție.

*Proliferare celulară*: creșterea numărului de celule ca rezultat al diviziunii celulare mitotice.

*Centromer*: regiunea ADN-ului unui cromozom unde cele două cromatide sunt legate între ele și pe care cei doi kinetocori sunt fixați unul lângă altul.

*Clastogen*: orice substanță sau proces care cauzează aberații cromozomiale structurale în populații de celule sau organisme.

*Citocineză*: procesul de diviziune celulară care survine imediat după mitoză pentru a forma două celule fiice, fiecare conținând un nucleu unic.

*Indice de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (Cytokinesis-Block Proliferation index, CBPI)*: proporția de celule provenite de la a doua diviziune în populația tratată în raport cu populația martor netratată (a se vedea formulele din apendicele 2).

*Citostază*: inhibarea creșterii celulare (a se vedea formulele din apendicele 2).

*Citotoxicitate*: efecte dăunătoare asupra structurii sau funcțiilor celulare antrenând în final moartea celulară.

*Genotoxic*: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv ruperi, aducții, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

*Celule în interfază*: celule care nu se află în etapa de mitoză.

*Kinetocor*: structură proteică situată la nivelul centromerului unui cromozom la care se asociază fibrele fusoriale în timpul diviziunii celulare, permițând mișcarea ordonată a cromozomilor-fii către polii celulelor-fiice.

*Micronuclee*: nuclee mici, separate și adiționale nucleelor principale ale celulelor, formate în timpul telofazei mitozei sau meiozei pornind de la cromozomi întregi sau de la fragmente de cromozomi întârziați.

*Mitoză*: divizarea nucleului celular, în general, descompus în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

*Indice mitotic*: raportul dintre numărul de celule în metafază și numărul total de celule observate într-o populație celulară; acesta oferă un indiciu cu privire la gradul de proliferare celulară a populației respective.

*Mutagen*: agent care produce o modificare ereditară uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN genic sau structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

**▼ M3**

*Nondisjunctie:* lipsa separării unei perechi de cromatide, care nu reușesc prin urmare să migreze în mod corespunzător către celulele-fiice formate, fapt care determină prezența unui număr anormal de cromozomi în celulele-fiice.

*Poliploidie:* aberații cromozomiale numerice în celule sau organisme implicând unul sau mai multe seturi întregi de cromozomi, spre deosebire de unul sau mai mulți cromozomi izolați (aneuploidie).

*Indice de proliferare (PI):* metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu este folosită citoB (a se vedea formula din apendicele 2).

*Creștere relativă a numărului de celule (Relative Increase in Cell Count, RICC):* metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu este folosită citoB (a se vedea formula din apendicele 2).

*Dublarea relativă a populației (Relative Population Doubling, RPD):* metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu este folosită citoB (a se vedea formula din apendicele 2).

*Indice de replicație (RI):* proporția ciclurilor de diviziune celulară complete într-o cultură tratată în raport cu cultura martor netratată, în timpul perioadei de expunere și de recuperare (a se vedea formula din apendicele 2).

*Substanță chimică de test (denumită, de asemenea, substanță de test):* orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei MT.

▼ **M3***Apendicele 2***Formule pentru evaluarea citotoxicității**

1. În cazul utilizării *citoB*, evaluarea citotoxicității se bazează pe indicele de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) sau pe indicele de replicare (RI) (16) (58). CBPI indică numărul mediu de cicluri celulare pe celulă efectuate în timpul perioadei de expunere la *citoB* și poate fi utilizat pentru a calcula proliferarea celulară. RI indică numărul relativ de nuclee prezente în culturile tratate comparativ cu culturile martor și poate fi utilizat pentru calcularea procentajului de citostază:

$$\% \text{ citostază} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

cu:

T = cultură tratată cu substanța chimică de test

C = cultură martor tratată cu vehicul

unde:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{nr. de celule mononucleate}) + (2 \times \text{nr. de celule binucleate}) + (3 \times \text{nr. de celule multinucleate}))}{(\text{numărul total de celule})}$$

Astfel, un CBPI egal cu 1 (toate celulele sunt mononucleate) este echivalent cu o citostază de 100 %.

$$\text{Citostază} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{nr. de celule binucleate}) + (2 \times \text{nr. de celule multinucleate})) \div (\text{numărul total de celule})_T}{((\text{nr. de celule binucleate}) + (2 \times \text{nr. de celule multinucleate})) \div (\text{numărul total de celule})_C} \times 100$$

T = culturi tratate

C = culturi martor

2. Astfel, un RI de 53 % înseamnă că, comparativ cu numărul de celule care au efectuat o diviziune celulară pentru a forma celule binucleate și multinucleate în cultura martor, doar 53 % din celule au efectuat o diviziune în cultura tratată, și anume o citostază de 47 %.

3. În absența utilizării *citoB*, se recomandă evaluarea citotoxicității pe baza creșterii relative a numărului de celule (RICC) sau a dublării relative a populației (RPD) (58), deoarece ambele iau în considerare proporția de celule care au efectuat o diviziune celulară.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{creșterea numărului de celule în culturile tratate (final – inițial)})}{(\text{creșterea numărului de celule în culturile martor (final – inițial)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{nr. de dublări ale populației în culturile tratate})}{(\text{nr. de dublări ale populației în culturile martor})} \times 100$$



**▼ M3**

unde:

dublarea populației =  $[\log (\text{număr de celule post-tratament} \div \text{numărul inițial de celule})] \div \log 2$

4. Astfel, un RICC sau un RPD de 53 % indică o citotoxicitate/citostază de 47 %.

5. Utilizând indicele de proliferare (PI), citotoxicitatea poate fi evaluată prin intermediul numărării clonelor compuse dintr-o celulă (cl1), 2 celule (cl2), 3 până la 4 celule (cl4) și 5 până la 8 celule (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI este, de asemenea, utilizat ca un parametru fiabil și util de citotoxicitate și pentru liniile celulare cultivate *in situ* în absența citoB (25) (26) (27) (28).

▼ **M3***Apendicele 3***Substanțe chimice de referință recomandate pentru evaluarea performanței <sup>(1)</sup>**

| Categorie                                     | Substanță chimică     | nr. CAS   | nr. CE    |
|---|-----------------------|-----------|-----------|
| 1. Clastogeni activi fără activare metabolică |                       |           |           |
|   | Cistozină arabinozidă | 147-94-4  | 205-705-9 |
|   | Mitomycină C          | 50-07-7   | 200-008-6 |
| 2. Clastogeni necesitând activare metabolică  |                       |           |           |
|   | Benzo(a)piren         | 50-32-8   | 200-028-5 |
|   | Ciclofosfamidă        | 50-18-0   | 200-015-4 |
| 3. Aneugeni                                   |                       |           |           |
|   | Colchicină            | 64-86-8   | 200-598-5 |
|   | Vinblastină           | 143-67-9  | 205-606-0 |
| 4. Substanțe negative                         |                       |           |           |
|   | Di(2-etilhexil)ftalat | 117-81-7  | 204-211-0 |
|   | Acid nalidixic        | 389-08-2  | 206-864-7 |
|   | Piren                 | 129-00-0  | 204-927-3 |
|   | Clorură de sodiu      | 7647-14-5 | 231-598-3 |

<sup>(1)</sup> Aceste substanțe chimice de referință reprezintă substanțele chimice a căror utilizare este recomandată. Înlocuirea sau adăugarea de substanțe chimice la prezenta listă de substanțe chimice de referință este posibilă dacă activitatea substanțelor în cauză este cunoscută, dacă induc formarea de micronuclee prin intermediul aceluiași mecanism de acțiune și dacă relevanța acestora este dovedită pentru substanțele chimice testate în cadrul procedurii MNvit. În funcție de scopul urmărit, justificarea poate să includă, de asemenea, un studiu de validare acoperind o mare diversitate de substanțe sau axat pe un spectru mai restrâns, limitat la clasa chimică a substanței de test sau la mecanismul de leziune examinat.

## ▼ M3

**B.50. SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: DA****INTRODUCERE**

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, modificând necesitățile de reglementare și considerațiile referitoare la bunăstarea animalelor. Prima metodă de testare (MT) (B.42) pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglioni limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429), a fost revizuită (1). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). În cadrul metodei LLNA, marcajul radioizotopic cu timidină sau iod este utilizat pentru a măsura proliferarea limfocitelor și, prin urmare, testul are o aplicare limitată în regiunile unde achiziționarea, utilizarea sau eliminarea produselor radioactive pun probleme. LLNA: DA (dezvoltată de către Daicel Chemical Industries, Ltd.) este o variantă non-radioactivă a LLNA, care cuantifică conținutul de adenosină trifosfat (ATP) prin bioluminescență ca indicator al proliferării celulare. Metoda de testare LLNA: DA a fost validată, revizuită și recomandată de către o echipă internațională de examinare care a recunoscut utilitatea acesteia în identificarea, între anumite limite, a substanțelor chimice care au sau nu un efect de sensibilizare a pielii (10) (11) (12) (13). Prezenta MT vizează evaluarea potențialului de sensibilizare dermică a substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Capitolul B.6 din prezenta anexă și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 utilizează testele pe cobai, și anume testul de maximizare la cobai și testul Buehler (14). LLNA (capitolul B.42 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea OECD nr. 429) și cele două variante non-radioactive, LLNA: DA (capitolul B.50 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 A) și LLNA: BrdU-ELISA (capitolul B.51 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 B) sunt mai avantajoase decât testele pe cobai din B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (14) în termeni de reducere și de rafinare a utilizării animalelor.
2. În mod similar cu LLNA, LLNA: DA studiază faza de inducție a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-răspuns. În plus, abilitatea de a detecta agenții de sensibilizare dermică fără a recurge la radiomarcarea ADN-ului elimină riscurile profesionale de expunere la radiații și problemele legate de gestionarea deșeurilor. În schimb, aceasta ar putea presupune o creștere a numărului de șoareci utilizați pentru detectarea agenților de sensibilizare dermică determinând, cu toate acestea, diminuarea numărului de cobai pentru testarea potențialului de sensibilizare dermică (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (14).

**DEFINIȚII**

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE**

4. Metoda LLNA: DA este o variantă a metodei LLNA vizând identificarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice, între anumite limite. Acest lucru nu implică în mod necesar faptul că LLNA: DA trebuie să înlocuiască sistematic LLNA sau testele pe cobai (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (14), ci mai curând, că testul reprezintă un instrument de calitate similară putând fi folosit ca alternativă și ale cărui rezultate pozitive sau negative nu mai necesită, în general, o confirmare suplimentară (10) (11). Anterior derulării studiului, laboratorul de

## ▼ M3

testare trebuie să colecteze toate informațiile disponibile cu privire la substanța de test. Astfel de informații includ identitatea și structura chimică a substanței de test; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele tuturor celorlalte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice privind substanțele chimice asociate din punct de vedere structural. Aceste informații trebuie analizate pentru a determina dacă metoda LLNA: DA este adecvată pentru substanța de test [având în vedere incompatibilitatea anumitor tipuri de substanțe chimice cu LLNA: DA (a se vedea punctul (5))] și pentru a contribui la alegerea dozelor adecvate.

5. LLNA: DA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea sensibilizării alergice de contact. Cu toate acestea, comparativ cu testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406), aceasta are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în acest scop (14). Mai mult, LLNA: DA oferă o rafinare importantă (reducerea durerii și a suferinței) a modului în care sunt utilizate animalele pentru testarea sensibilizării alergice de contact, deoarece, spre deosebire de B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, LLNA: DA nu se bazează pe declanșarea reacțiilor de hipersensibilitate dermică prin manifestarea declanșării. În ciuda avantajelor metodei LLNA: DA comparativ cu B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (14), există anumite limite care ar putea impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 [de exemplu, testarea anumitor metale, rezultate fals pozitive cu anumite substanțe iritante pentru piele (precum anumite substanțe tensioactive) (6) (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă), solubilitatea substanței de test]. În plus, anumite substanțe sau clase de substanțe chimice conținând grupele funcționale demonstrate ca acționând ca posibili factori de confuzie (16) ar putea impune utilizarea testelor pe cobai [și anume B.6; testarea OCDE privind testarea nr. 406 (14)]. Limitele identificate pentru LLNA (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă) se recomandă ca fiind aplicabile și în cazul LLNA: DA (10). În plus, utilizarea LLNA: DA ar putea fi inadecvată în cazul testării substanțelor care modifică nivelurile ATP (de exemplu, substanțele care acționează ca inhibitori ai ATP) sau al celor care perturbă măsurarea exactă a ATP intracelular (de exemplu, prezența de enzime care degradează ATP, prezența de ATP extracelular în ganglionul limfatic). În afara acestor limite identificate, LLNA: DA se aplică oricăror substanțe de test care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea testului LLNA: DA. Mai mult, trebuie luată în considerare posibilitatea obținerii de rezultate pozitive ambigue pentru care valorile indicelui de stimulare (IS) sunt cuprinse între 1,8 și 2,5 (a se vedea punctele 31-32). Acest fapt se bazează pe baza de date de validare de 44 de substanțe prezentând un IS  $\geq 1,8$  (a se vedea punctul (6) pentru care LLNA: DA a identificat corect toți cei 32 de agenți de sensibilizare LLNA, dar a identificat incorect trei dintre cei 12 agenți de non-sensibilizare LLNA prezentând un IS cuprins între 1,8 și 2,5 (și anume rezultate pozitive de limită) (10). Cu toate acestea, deoarece același set de date a fost utilizat pentru stabilirea valorilor IS și pentru calcularea proprietăților estimative ale testului, rezultatele indicate ar putea supraestima proprietățile estimative reale.

## PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA: DA este acela că agenții de sensibilizare induc o proliferare a limfocitelor în ganglionii limfatici care drenează porțiunea unde se aplică substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului și oferă o modalitate simplă de a obține măsurători cantitative ale sensibilizării. Proliferarea este măsurată prin compararea proliferării medii din fiecare grup de test cu proliferarea medie din grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se calculează raportul dintre proliferarea medie din fiecare grup tratat și proliferarea

▼ **M3**

medie din grupul VC, denumit IS, iar acesta trebuie să aibă o valoare  $\geq 1,8$  pentru a se putea evalua în continuare substanța de test ca și potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise aici se bazează pe cuantificarea conținutului de ATP prin bioluminescență (factor cunoscut ca fiind în corelație cu numărul de celule vii) (17) pentru a indica creșterea numărului de celule proliferate în ganglionii limfatici auriculari de drenare (18) (19). Această tehnică prin bioluminescență utilizează enzima luciferază pentru a cataliza formarea luminii pornind de la ATP și luciferină conform reacției următoare:



Intensitatea luminii emise urmărește o traiectorie liniară în funcție de concentrația ATP și se măsoară cu ajutorul unui luminometru. Testul luciferină-luciferază constituie o metodă precisă de cuantificare a ATP și este utilizat în numeroase aplicații (20).

**DESCRIEREA TESTULUI****Selectarea speciilor de animale**

7. Specia selectată pentru acest test este șoarecele. Studiile de validare a LLNA: DA au fost efectuate utilizându-se exclusiv animale din rasa CBA/J, considerată, prin urmare, rasa preferată (12) (13). Se folosesc femele adulte tinere, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre acestea trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza și alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA: DA specifice rasei și/sau sexului.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (21), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C ( $\pm 3$  °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

**Pregătirea animalelor**

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

**Pregătirea dozelor**

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora pe urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării pe urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

## ▼ M3

**Verificarea fiabilității**

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând în mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. O serie de autorități de reglementare solicită, de asemenea, existența unei PC pentru fiecare studiu, utilizatorii sunt astfel încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA: DA. Prin urmare, utilizarea sistematică a unei PC concomitente este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt ce este câteodată impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea punctul 12). PC trebuie să reacționeze pozitiv la LLNA: DA la un nivel de expunere estimat să determine o creștere a  $IS \geq 1,8$  față de grupul martor negativ (NC). Doza de PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (de exemplu, un  $IS > 10$  ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS 101-86-0) și eugenol 25 % (nr. CAS 97-53-0,) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, pot fi utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.
  
12. În timp ce includerea unui grup PC concomitent este recomandată, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale  $\leq 6$  luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA: DA în mod regulat (efectuează LLNA: DA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA: DA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecvente în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).
  
13. Un grup PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA: DA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau a reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în ceea ce privește determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.
  
14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile rezultatelor trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (22).

**▼ M3**

15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară, de asemenea, testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (23). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclusă un VC separat pentru PC concomitent.
16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:
  - similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;
  - caracteristici fizico-chimice cunoscute;
  - date justificative obținute cu ajutorul LLNA: DA;
  - date justificative obținute cu ajutorul altor modele animale și/sau de la om.

**PROCEDURA DE TESTARE****Număr de animale și doze**

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.
18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor oferite în referințele (2) și (24). Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test de interes (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (24) (25). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă pre-screening de testare (a se vedea punctele 21-24).
19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii concentrației maxime posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona: ulei de măsline (4:1, v/v), N,N-dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (6), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.

## ▼ M3

20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-indivizi și o comparare statistică a măsurătorilor privind substanța de test și a celor privind grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea punctul 33). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul PC este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (22). Mai mult, o serie de autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Colectarea regulată de date specifice fiecărui animal contribuie la bunăstarea animalelor prin evitarea testelor duplicate care ar fi necesare dacă rezultatele obținute în alt mod (de exemplu, cu date colective pentru grupuri de animale) ar trebui ulterior înaintate unor autorități de reglementare care prevăd alte cerințe (de exemplu, furnizarea de date individuale).

**Testarea preliminară**

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA: DA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA: DA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.
22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA: DA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă una sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 8). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor și se punctează folosind tabelul 1 (25). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze), ziua 7 (24 de ore înainte de încheiere) și ziua 8. În plus, în ziua 8, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de  $\geq 3$  și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (26) (27). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA: DA este doza imediat inferioară din seria de concentrații pre-screening (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

**Punctaje acordate eritemelor**

| Observație                            | Punctaj |
|---------------------------------------|---------|
| Fără eritem                           | 0       |
| Eritem foarte ușor (abia perceptibil) | 1       |
| Eritem bine definit                   | 2       |



## ▼ M3

| Observație   | Punctaj |
|--|---------|
| Eritem moderat spre grav   | 3       |
| Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului | 4       |

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (26) (27), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu șoarecii martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cu toate acestea, deși pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (30) (31) (32) (33) (34).

24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (35) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA: DA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și orice semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutateii corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 8, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (36).

#### Schema de tratament a studiului principal

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

- *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică o soluție apoasă de lauril sulfat de sodiu (SLS) 1 % în regiunea dorsală a fiecărei urechi cu ajutorul unei pensule muiate în soluția SLS, astfel încât să se acopere întreaga suprafață dorsală a fiecărei urechi cu patru până la cinci aplicări. După o oră de la aplicarea tratamentului cu SLS, se aplică 25 µL de substanță de test diluată în mod adecvat, doar din vehicul sau din PC (concomitent sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.
- *Zilele 2, 3 și 7:* Se repetă tratamentul prealabil cu soluție apoasă de SLS 1 % apoi se aplică substanța de test urmând aceeași procedură ca în ziua 1.
- *Zilele 4, 5 și 6:* Nu se aplică tratament.
- *Ziua 8:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal și toate observațiile clinice. După aproximativ 24-30 de ore de la începutul aplicării (în ziua 7), animalele se eutanasiază. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în soluție tamponată cu fosfat (PBS) pentru fiecare animal. Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi găsite în referință (22). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutateii eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).

▼ **M3****Prepararea suspensiilor celulare**

26. Pentru fiecare șoarece, se prepară o suspensie de celule izolate provenind din ganglionii limfatici (LNC) excizați bilateral, prin plasarea ganglionilor între două lamele din sticlă pe care se exersează o presiune ușoară pentru a strivi eșantioanele. După ce s-a verificat faptul că țesutul s-a răspândit adecvat, se separă cele două lamele. Se suspendă țesutul de pe ambele lamele în PBS, înclinând fiecare lamelă deasupra cutiei Petri apoi se clătește cu PBS răzuind concomitent țesutul de pe lamelă cu o rașchetă pentru celule. Ganglionii limfatici de la animalele din NC fiind mici, este important ca aceștia să fie tratați cu grijă pentru a se evita orice efecte artificiale induse valorilor IS. Volumul total de PBS utilizat pentru clătirea celor două lamele este de 1 mL. Se omogenizează ușor suspensia de LNC în cutia Petri cu ajutorul rașchetei pentru celule. Se prelevează apoi o alicotă de 20 µL de suspensie LNC cu o micropipetă, având grijă să nu se desprindă membrana vizibilă cu ochiul liber, apoi aceasta se amestecă cu 1,98 mL de PBS pentru a se obține un eșantion de 2 mL. Un al doilea eșantion de 2 mL se prepară respectând aceeași procedură, astfel încât să fie preparate 2 eșantioane pentru fiecare animal.

**Determinarea proliferării celulare (măsurarea conținutului de ATP din limfocite)**

27. Creșterile de conținut ATP din ganglionii limfatici se măsoară prin metoda luciferină/luciferază cu un set de măsurare a ATP care măsoară bioluminescența, exprimată în unități relative de luminiscentă (RLU). Timpul dintre eutanasierea animalelor și cuantificarea conținutului de ATP pentru fiecare individ trebuie să fie menținut constant și să nu depășească aproximativ 30 de minute deoarece se consideră că ATP se diminuează treptat de la momentul eutanasierii (12). Astfel, seria de proceduri de la excizarea nodulilor limfatici auriculari până la măsurarea conținutului de ATP trebuie să fie realizată în 20 de minute, conform unui program pre-stabilit valabil pentru toate animalele. Luminiscența datorată conținutului de ATP trebuie măsurată în toate eșantioanele de 2 mL, și anume un total de două măsurători ale ATP pentru fiecare animal. Se determină apoi media rezultatelor, iar aceasta este utilizată în calculele următoare (a se vedea punctul 30).

**OBSERVAȚII****Observații clinice**

28. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricăror semne clinice, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau corозиunea pielii în vederea eutanasierii (36).

**Greutatea corporală**

29. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

**CALCULAREA REZULTATELOR**

30. Rezultatele pentru fiecare grup tratat se exprimă printr-un indice de stimulare (IS) mediu. IS se calculează împărțind media RLU/șoarece în fiecare grup tratat cu substanța de test și grupul PC la media RLU/șoarece în grupul martor tratat cu solvent/vehicul (VC). IS mediu pentru VC este, prin urmare, egal cu 1.

**▼ M3**

31. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când  $IS \geq 1,8$  (10). Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită (și anume, cu valori ale IS cuprinse între 1,8 și 2,5) ca fiind pozitiv (2) (3) (37).
32. În cazul unui răspuns pozitiv ambiguu cu valori ale IS cuprinse între 1,8 și 2,5, experimentatorii pot examina informații adiționale precum relația doză-răspuns, manifestările de toxicitate sistemică sau iritație excesivă și, dacă este cazul, semnificația statistică împreună cu valorile IS pentru a confirma că astfel de rezultate sunt pozitive (10). Diferitele proprietăți ale substanței de test trebuie, de asemenea, luate în considerare, inclusiv o eventuală analogie structurală cu agenți de sensibilizare dermică cunoscuți, declanșarea unei iritații dermice excesive la șoarece și natura relației doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt examinate în detaliu într-un alt document (4).
33. Colectarea de date pentru fiecare șoarece permite o analiză statistică a existenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparații ale grupurilor testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparații pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul varianțelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite uneori „valori aberante”).

**DATE ȘI RAPORTARE****Date**

34. Datele se sistematizează sub formă de tabele indicând valorile RLU pentru fiecare animal, media RLU/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) și indicele de stimulare mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul.

**Raportul de testare**

35. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de test și cele martor:

- date de identificare (de exemplu, numărul CAS și numărul CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);
- starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);
- în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

- date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);
- justificarea alegerii vehiculului;

**▼ M3**

Animalele de experiență:

- proveniența șoarecilor CBA;
- statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

- sursa, numărul lotului, datele furnizate de producător cu privire la asigurarea calității/controlului de calitate pentru setul ATP;
- detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;
- justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);
- concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);
- detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;
- detalii privind oricare abateri de la protocol și explicații referitoare la modul în care abaterea afectează conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

- un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;
- rezultatele martorilor specifici laboratorului de testare pentru pozitiv concomitent și/sau istoric, precum și pentru martorul negativ concomitent;
- în cazul în care nu a fost inclus un grup PC concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent grup PC periodic și un raport detaliind datele istorice privind PC specifice laboratorului, astfel încât să se justifice de ce nu a fost realizat un grup PC concomitent;

Rezultate:

- greutatea fiecărui animal la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;
- momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;
- ora eutanasierii animalului și ora măsurării conținutului de ATP pentru fiecare animal;
- un tabel cu valorile RLU și IS pe șoarece pentru fiecare grup tratat;
- media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a RLU/șoarece pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante în cadrul fiecărui grup;

## ▼ M3

— indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în grupurile tratate cu substanța de test, cât și în grupurile martor;

— relația doză-răspuns;

— analize statistice, dacă este cazul;

Discutarea rezultatelor:

— un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, și o concluzie care să indice dacă substanța de test trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]

## ▼ M3

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf)].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

## ▼ M3

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)]
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]



## ▼ M3

## Apendicele 1

## DEFINIȚII

*Acuratețe:* Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (38).

*Substanță etalon:* O substanță de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

*Fals negativ:* O substanță de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, aceasta fiind de fapt pozitivă sau activă.

*Fals pozitiv:* O substanță de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, aceasta fiind de fapt negativă sau inactivă.

*Pericol:* Potențialul de efect negativ asupra mediului sau sănătății. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

*Reproductibilitatea inter-laborator:* Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproducibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de validare prealabilă și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes inter-laborator, denumită, de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (38).

*Reproductibilitatea intra-laborator:* O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (38).

*Valoare aberantă:* O valoare aberantă este o observație considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eșantion aleatoriu dintr-o populație.

*Asigurarea calității:* Un proces de gestionare prin care aderarea la standardele și cerințele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor și acuratețea transferului de date sunt evaluate de către persoane independente de cele care au efectuat testarea.

*Fiabilitate:* Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (38).

*Sensibilizare dermică:* Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun ce poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

*Indice de stimulare (IS):* O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test, și anume raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate și cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

*Substanța de test (denumită, de asemenea, substanță chimică de test):* Orice substanță sau amestec testat prin intermediul prezentei metode de testare.



## ▼ M3

**B.51. SENSIBILIZARE DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: BrdU-ELISA****INTRODUCERE**

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, modificând necesitățile de reglementare și considerațiile referitoare la bunăstarea animalelor. Prima metodă de testare (MT) (B.42) pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglioni limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429), a fost revizuită (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). În cadrul metodei LLNA, marcajul radioizotopic cu timidină sau iod este utilizat pentru a măsura proliferarea limfocitelor, prin urmare, testul are o aplicare limitată în regiunile unde achiziționarea, utilizarea sau eliminarea produselor radioactive pun probleme. LLNA: BrdU-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – testul de imunoabsorbție prin enzimă legată) este o variantă non-radioactivă a MT LLNA, care utilizează 5-bromo-2-dezoxiuridina (BrdU) (nr. CAS 59-14-3) non-radiomarcată într-un test de tip ELISA pentru a măsura proliferarea limfocitelor. Metoda de testare LLNA: BrdU-ELISA a fost validată, revizuită și recomandată de către o echipă internațională de examinare care a recunoscut utilitatea acesteia în identificarea, între anumite limite, a substanțelor chimice care au sau nu un efect de sensibilizare a pielii (10) (11) (12). Prezenta MT vizează evaluarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Capitolul B.6 din prezenta anexă și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 utilizează testele pe cobai, și anume testul de maximizare la cobai și testul Buehler (14). LLNA (capitolul B.42 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea OECD nr. 429) și cele două variante non-radioactive, LLNA: BrdU-ELISA (capitolul B.51 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 B) și LLNA: DA (capitolul B.50 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 A), sunt mai avantajoase decât testele pe cobai din B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13) în termeni de reducere și de rafinare a utilizării animalelor.
2. În mod similar cu LLNA, metoda LLNA: BrdU-ELISA studiază faza de inducție a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-răspuns. În plus, abilitatea de a detecta agenții de sensibilizare dermică fără a recurge la radiomarcarea ADN-ului elimină riscurile profesionale de expunere la radiații și problemele legate de gestionarea deșeurilor. În schimb, aceasta ar putea presupune o creștere a numărului de șoareci utilizați pentru detectarea agenților de sensibilizare dermică determinând, cu toate acestea, diminuarea numărului de cobai pentru testarea potențialului de sensibilizare dermică (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13).

**DEFINIȚII**

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE**

4. Metoda LLNA: BrdU-ELISA este o variantă a metodei LLNA vizând identificarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice, între anumite limite. Aceasta nu implică în mod necesar faptul că LLNA: BrdU-ELISA trebuie să înlocuiască sistematic LLNA sau testele pe cobai (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), ci, mai curând, că testul reprezintă un instrument de o calitate similară care poate fi utilizat ca alternativă și ale cărui rezultate pozitive sau negative nu mai necesită, în general, o confirmare suplimentară (10) (11). Anterior derulării studiului, laboratorul de testare trebuie să colecteze toate informațiile disponibile cu privire la substanța de test. Astfel de informații includ

## ▼ M3

identitatea și structura chimică a substanței de test; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatelor tuturor celorlalte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice privind substanțele chimice asociate din punct de vedere structural. Aceste informații trebuie analizate pentru a determina dacă metoda LLNA: BrdU-ELISA este adecvată pentru substanța de test [având în vedere incompatibilitatea anumitor tipuri de substanțe chimice cu LLNA: BrdU-ELISA (a se vedea punctul 5) și pentru a contribui la alegerea dozelor adecvate.

5. Metoda LLNA: BrdU-ELISA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea sensibilizării alergice de contact. Cu toate acestea, comparativ cu testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406), aceasta are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în acest scop (13). Mai mult, LLNA: BrdU-ELISA oferă o rafinare importantă a modului în care sunt utilizate animalele pentru testarea sensibilizării alergice de contact, deoarece, spre deosebire de B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, LLNA: BrdU-ELISA nu se bazează pe declanșarea reacțiilor de hipersensibilitate dermică prin manifestarea declanșării. În plus, LLNA: BrdU-ELISA nu necesită utilizarea unui adjuvant ca în cazul testului de maximizare pe cobai (capitolul B.6 din prezenta anexă, 13). Astfel, LLNA: BrdU-ELISA reduce suferința animalelor. În ciuda avantajelor LLNA: BrdU-ELISA comparativ cu B.6 și cu orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13), există anumite limite care ar putea impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 [de exemplu, testarea anumitor metale, rezultate fals pozitive cu anumite substanțe iritante pentru piele (precum anumite substanțe tensioactive) (6) (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă), solubilitatea substanței de test]. În plus, anumite substanțe sau clase de substanțe chimice conținând grupele funcționale demonstrate ca reprezentând posibili factori de confuzie (15) ar putea impune utilizarea testelor pe cobai [de exemplu, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13)]. Limitele identificate pentru LLNA (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă) se recomandă ca fiind aplicabile și în cazul LLNA: BrdU-ELISA (10). În afara acestor limite identificate, LLNA: BrdU-ELISA se aplică oricăror substanțe de test care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea testului LLNA: BrdU-ELISA. Mai mult, trebuie luată în considerare posibilitatea obținerii de rezultate pozitive limită pentru care valorile indicelui de stimulare (IS) sunt cuprinse între 1,6 și 1,9 (a se vedea punctele 31-32). Acest fapt se bazează pe baza de date de validare alcătuită din 43 de substanțe prezentând un  $IS \geq 1,6$  (a se vedea punctul 6) pentru care LLNA: BrdU-ELISA a identificat corect toți cei 32 de agenți de sensibilizare LLNA, dar a identificat incorect doi dintre cei 11 agenți de non-sensibilizare LLNA prezentând un IS cu valori cuprinse între 1,6 și 1,9 (și anume rezultate pozitive de limită) (10). Cu toate acestea, deoarece același set de date a fost utilizat pentru stabilirea valorilor IS și pentru calcularea proprietăților estimative ale testului, rezultatele indicate ar putea supraestima proprietățile estimative reale.

## PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA: BrdU-ELISA este acela că agenții de sensibilizare induc o proliferare a limfocitelor în ganglionii limfatici care drenează porțiunea unde se aplică substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului și oferă o modalitate simplă de a obține măsurători cantitative ale sensibilizării. Proliferarea este măsurată prin compararea proliferării medii din fiecare grup de test cu proliferarea medie din grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se calculează raportul dintre proliferarea medie din fiecare grup tratat și proliferarea medie din grupul VC, denumit IS, care trebuie să aibă o valoare  $\geq 1,6$  pentru a se putea evalua în continuare substanța de

**▼ M3**

test ca potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise aici se bazează pe măsurarea conținutului de BrdU pentru a indica creșterea numărului de celule în proces de proliferare în ganglionii limfatici auriculari de drenare. BrdU este un analog al timidinei care se încorporează în același mod în ADN-ul celulelor în proces de proliferare. Incorporarea BrdU se măsoară cu ELISA, care utilizează un anticorp specific pentru BrdU marcat, de asemenea, cu peroxidază. Peroxidaza reacționează apoi cu un substrat adăugat special pentru a produce un compus colorat dozat cu un sistem de redare a plăcilor de microtitrare la o absorbantă specifică.

**DESCRIEREA TESTULUI****Selectarea speciilor de animale**

7. Specia selectată pentru acest test este șoarecele. Studiile de validare a LLNA: BrdU-ELISA au fost efectuate utilizându-se exclusiv animale din rasa CBA/JN, considerată, prin urmare, rasa preferată (10) (12). Se folosesc femele adulte tinere, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre acestea trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza și alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA: BrdU-ELISA specifice rasei și/sau sexului.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (16), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

**Pregătirea animalelor**

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

**Pregătirea dozelor**

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora pe urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării pe urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

**Verificarea fiabilității**

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând în mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. Anumite autorități solicită, de asemenea,

## ▼ M3

existența unei PC pentru fiecare studiu; prin urmare, utilizatorii sunt încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA: BrdU-ELISA. Prin urmare, utilizarea sistematică a unei PC concomitente este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt care este câteodată impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea punctul 12). PC trebuie să reacționeze pozitiv la LLNA: BrdU-ELISA la un nivel de expunere estimat să determine o creștere a  $IS \geq 1,6$  față de grupul martor negativ (NC). Doza de PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (de exemplu, un  $SI > 14$  ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS 101-86-0) și eugenol 25 % (nr. CAS 97-53-0) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, este posibil să fie utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.

12. În timp ce includerea unui grup PC concomitent este recomandată, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale  $\leq 6$  luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA: BrdU-ELISA în mod regulat (efectuează LLNA: BrdU-ELISA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA: BrdU-ELISA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecutive în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).
13. Un PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA: BrdU-ELISA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau a reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.
14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile rezultatelor trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (17).
15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară și testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (18). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclus un VC separat pentru PC concomitent.

▼ **M3**

16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

- similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;
- caracteristici fizico-chimice cunoscute;
- date justificative provenind de la LLNA: BrdU-ELISA;
- date justificative provenind de la alte modele animale și/sau de la om.

**PROCEDURA DE TESTARE****Număr de animale și doze**

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.
18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor oferite în referințele 2 și 19. Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test în cauză (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive, astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (19) (20 și capitolul B.4 din prezenta anexă). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă preliminară de testare (a se vedea punctele 21-24).
19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii celei mai mari concentrații posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona; ulei de măsline (4:1, v/v), N,N-dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (6), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.

## ▼ M3

20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-animale și o comparare statistică a diferențelor dintre substanța de test și măsurătorile pe grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea punctul 33). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul PC este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (17). Mai mult, anumite autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Colectarea regulată de date specifice fiecărui animal contribuie la bunăstarea animalelor prin evitarea testelor duplicate care ar fi necesare dacă rezultatele obținute în alt mod (de exemplu, cu date colective pentru grupuri de animale) ar trebui ulterior înaintate unor autorități de reglementare cu alte cerințe (de exemplu, furnizarea de date individuale).

## Testarea preliminară

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA: BrdU-ELISA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA: BrdU-ELISA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.
22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA: BrdU-ELISA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă unul sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 6). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor, iar rezultatul se notează în tabelul 1 (20 și capitolul B.4 din prezenta anexă). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze) și în ziua 6. În plus, în ziua 6, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de  $\geq 3$  și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (21) (22). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA: BrdU-ELISA este doza imediat inferioară din seria de concentrații (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

## Punctaje acordate eritemelor

| Observație                            | Punctaj |
|---------------------------------------|---------|
| Fără eritem                           | 0       |
| Eritem foarte ușor (abia perceptibil) | 1       |
| Eritem bine definit                   | 2       |

## ▼ M3

| Observație   | Punctaj |
|--|---------|
| Eritem moderat spre grav   | 3       |
| Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului | 4       |

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (21) (22), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu șoarecii martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cu toate acestea, deși pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (25) (26) (27) (28) (29).
24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (30) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA: BrdU-ELISA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și orice semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutateii corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 6, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (31).

**Schema de tratament a studiului principal**

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

- *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică 25 µL de substanță de test diluată în mod adecvat, doar din vehicul sau din PC (concomitent sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.
- *Zilele 2 și 3:* Se repetă procedura de aplicare efectuată în ziua 1.
- *Ziua 4:* Nu se aplică tratament.
- *Ziua 5:* Se injectează intraperitoneal 0,5 ml (5 mg/șoarece) de soluție BrdU (10 mg/ml).
- *Ziua 6:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal și toate observațiile clinice. După aproximativ 24 de ore (24 h) de la injecția cu BrdU, animalele se eutanasiază. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în soluție tamponată cu fosfat (PBS) pentru fiecare animal. Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi consultate în referința (17). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutății eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).



▼ **M3****Prepararea suspensiilor celulare**

26. Pentru fiecare șoarece, se prepară o suspensie de celule izolate provenind din ganglionii limfatici (LNC) excizați bilateral printr-o separare mecanică ușoară realizată cu ajutorul unei site din oțel inoxidabil cu ochiuri de 200 μm sau o altă tehnică acceptabilă de generare a unei singure suspensii celulare (de exemplu, utilizarea unui mojar din plastic de unică folosință pentru a strivi ganglionii limfatici înainte de a-i trece printr-o sită din nylon cu ochiuri de 70 μm). Procedura pentru prepararea suspensiei LNC constituie o etapă crucială în cadrul testului și, prin urmare, trebuie stăpânită în prealabil de către fiecare operator. În plus, ganglionii limfatici prelevați de la animalele din grupul NC sunt mici și, prin urmare, este importantă manipularea cu grijă a acestora pentru a evita orice perturbare a valorilor IS. În orice caz, volumul suspensiei de LNC trebuie să corespundă unui volum optimizat prestabilit (aproximativ 15 ml). Volumul optimizat se bazează pe atingerea unei absorbante medii a grupului NC situată între 0,1-0,2.

**Determinarea proliferării celulare (măsurarea conținutului de BrdU din ADN-ul limfocitelor)**

27. BrdU se măsoară cu ajutorul unui set de măsurare ELISA disponibil în comerț (de exemplu Roche Applied Science, Mannheim, Germania, nr. catalog 11 647 229 001). Pe scurt, se adaugă 100 μl de suspensie de LNC în compartimentele unei microplăci cu baza plată, în triplicate. După fixarea și denaturarea LNC, se adaugă anticorpus anti-BrdU în fiecare compartiment și se lasă să reacționeze. Ulterior, anticorpus anti-BrdU se îndepărtează prin spălare, apoi se adaugă soluția de substrat și se lasă pentru a permite sintetizarea cromogenului. Se măsoară absorbanta la 370 nm cu o lungime de undă de referință fixată la 492 nm. În toate cazurile, condițiile de testare trebuie optimizate (a se vedea punctul 26).

**OBSERVAȚII****Observații clinice**

28. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricărui semn clinic, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau corозиunea pielii în vederea eutanasierii (31).

**Greutatea corporală**

29. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

**CALCULAREA REZULTATELOR**

30. Rezultatele pentru fiecare grup tratat se exprimă printr-un IS mediu. IS se calculează împărțind indicele de marcarea BrdU mediu al fiecărui grup tratat cu substanța de test și PC la indicele de marcarea BrdU mediu al grupului martor tratat cu solvent/vehicul (VC). IS mediu pentru VC este, prin urmare, egal cu 1.

Indicele de marcarea BrdU se calculează după cum urmează:

$$\text{indice de marcarea BrdU} = \frac{(\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{blank}_{\text{em}}})}{(\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{blank}_{\text{ref}}})}$$

unde em = lungimea unei de emisie; și ref = lungimea unei de referință.



▼ **M3**

31. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când  $IS \geq 1,6$  (10). Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită (și anume cu valori ale IS cuprinse între 1,6 și 1,9) ca fiind pozitiv (3) (6) (32).
32. În cazul unui răspuns pozitiv ambiguu cu valori ale IS cuprinse între 1,6 și 1,9, experimentatorii pot examina informații adiționale precum relația doză-răspuns, manifestările de toxicitate sistemică sau iritație excesivă și, dacă este cazul, semnificația statistică împreună cu valorile IS pentru a confirma că astfel de rezultate sunt pozitive (10). Trebuie luate în considerare diferențele proprietăți ale substanței de test, inclusiv o eventuală analogie structurală cu agenți de sensibilizare dermică cunoscuți, declanșarea unei iritații dermice excesive la șoarece și natura relației doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt examinate în detaliu în alt document (4).
33. Colectarea de date pentru fiecare șoarece permite o analiză statistică a existenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparații între grupurile testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparații pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul varianțelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite câteodată „valori aberante”).

**DATE ȘI RAPORTARE****Date**

34. Datele se sistematizează sub formă de tabele, indicând indicii de marcare BrdU pentru fiecare animal, media indicilor de marcare BrdU/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) și IS mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul.

**Raportul de testare**

35. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de test și cele martor:

- date de identificare (de exemplu, numărul CAS și CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);
- starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);
- în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

- date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);
- justificarea alegerii vehiculului;

**▼ M3**

Animalele de experiență:

- proveniența șoarecilor de rasa CBA;
- statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

- sursa, numărul lotului, datele furnizate de producător cu privire la asigurarea calității/controlului de calitate (sensibilitatea și specificitatea anticorpilor, limitele de detecție) pentru setul ELISA;
- detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;
- justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);
- concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);
- detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;
- detalii privind oricare abateri de protocol și explicații referitoare la modul în care acestea afectează conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

- un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;
- rezultatele martorilor specifici laboratorului de testare pentru martorul pozitiv concomitent și/sau istoric, precum și pentru martorul negativ concomitent (solvent/vehicul);
- în cazul în care nu a fost inclus un grup PC concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent grup PC periodic și un raport detaliind datele istorice privind PC specifice laboratorului astfel încât să se justifice de ce nu a fost realizat un grup PC concomitent;

Rezultate:

- greutatea fiecărui animal la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;
- momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;
- un tabel al indicilor de marcarea BrdU și cu valorile IS pentru fiecare șoarece și pentru fiecare grup tratat;
- media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a indicilor de marcarea BrdU/șoarece pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante în cadrul fiecărui grup tratat;

▼ **M3**

— indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în grupurile tratate cu substanța de test, cât și în grupurile martor;

— relația doză-răspuns;

— analize statistice, dacă este cazul;

Discutarea rezultatelor:

— un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, precum și o concluzie care să indice dacă substanța de test trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]

## ▼ M3

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf)]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼ **M3**

- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

## ▼ M3

## Apendicele 1

## DEFINIȚII

*Acuratețe:* Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (33).

*Substanță etalon:* O substanță de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

*Fals negativ:* O substanță de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, ea fiind de fapt pozitivă sau activă (33).

*Fals pozitiv:* O substanță de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, ea fiind de fapt negativă sau inactivă (33).

*Pericol:* Potențialul de efect negativ ecologic sau pentru sănătate. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

*Reproductibilitatea inter-laborator:* Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproducibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes inter-laborator, denumită de asemenea, reproductibilitate inter-laborator (33).

*Reproductibilitatea intra-laborator:* O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (33).

*Valoare aberantă:* O valoare aberantă este o observație considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eșantion aleatoriu dintr-o populație.

*Asigurarea calității:* Un proces de management prin care sunt evaluate aderarea la standardele și cerințele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor și acuratețea transferului de date de către persoane independente de cele care au efectuat testarea.

*Fiabilitate:* Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (33).

*Sensibilizare dermică:* Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun care poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

*Indice de stimulare (IS):* O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test, și anume raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate și cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

*Substanța de test (denumită, de asemenea, substanță chimică de test):* Orice substanță sau amestec testat utilizându-se prezenta metodă de testare.

## ▼ M4

**B.52. TOXICITATE ACUTĂ PRIN INHALARE – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 436 (2009) a OCDE. Prima orientare 403 pentru testarea toxicității acute prin inhalare a fost adoptată în 1981, fiind ulterior modificată [a se vedea capitolul B.2 din prezenta anexă (1)]. Dezvoltarea unei metode pentru clasa de toxicitate acută prin inhalare (ATC) (2) (3) (4) a fost considerată necesară în urma revizuirii metodei ATC pe cale orală (capitolul B.1 tris din prezenta anexă) (5). O evaluare retrospectivă a performanței metodei de testare ATC pentru toxicitatea acută prin inhalare a arătat că această metodă poate fi utilizată în scopuri de clasificare și etichetare (6). Metoda de testare ATC prin inhalare va permite utilizarea unei serii succesive de concentrații țintă fixate pentru clasificarea nivelurilor de toxicitate ale unei substanțe chimice testate. Indicatorul cheie de rezultat folosit este letalitatea, totuși animalele care prezintă semne de durere sau suferință profundă sau sunt muribunde ar trebui eutanasiate pentru a li se reduce suferința. Orientări privind efectele etice acceptate sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 19 (7).
2. Orientări privind desfășurarea și interpretarea acestei metode de testare sunt disponibile în Ghidul nr. 39 privind testarea la toxicitate acută prin inhalare (8).
3. Definițiile utilizate în contextul acestei metode de testare sunt disponibile în apendicele 1 și în Ghidul 39 (8).
4. Metoda de testare furnizează informații privind proprietățile periculoase și permite clasificarea substanței chimice testate în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 de clasificare a substanțelor chimice care cauzează toxicitate acută (9). În cazul în care sunt necesare estimări punctuale ale valorilor  $CL_{50}$  sau analize ale relației concentrație-răspuns, metoda de testare adecvată este cea prezentată în capitolul B.2 din prezenta anexă (1). Orientări suplimentare privind selecția metodei de testare sunt disponibile în Ghidul 39 (8). Această metodă de testare nu este destinată exclusiv materialelor speciale, cum sunt materialele izometrice sau fibroase puțin solubile sau nanomaterialele fabricate.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

5. Înainte de a aplica această metodă, laboratorul de testare ar trebui să ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța chimică testată, inclusiv rezultatele studiilor existente ale căror date ar susține neefectuarea unor teste suplimentare pentru a reduce la minimum testele pe animale. Informațiile utile în selecția speciei, sușei, sexului, modului de expunere și al concentrațiilor de testare adecvate includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, utilizarea (utilizările) preconizată (preconizate) și potențialul de expunere la om, datele (Q)SAR și datele toxicologice disponibile referitoare la substanțele chimice înrudite cu aceasta din punct de vedere structural. Concentrațiile despre care se știe că provoacă dureri și suferințe profunde din cauza acțiunilor corozive <sup>(1)</sup> sau puternic iritante nu ar trebui testate prin această metodă [a se vedea Ghidul 39 (8)].

<sup>(1)</sup> Caracterul coroziv poate fi stabilit de experți pe baza următoarelor: semne observate la oameni și animale, date (in vitro) existente – de exemplu, capitolele B.40 (10), B.40 bis (11) din prezenta anexă sau orientarea nr. 435 a OCDE (12), valorile pH-ului, informații privind substanțe chimice similare sau orice alte date relevante.

▼ **M4****PRINCIPIUL TESTULUI**

6. Conform principiului acestui test, clasificarea substanței chimice testate este posibilă atunci când au fost obținute informații suficiente privind toxicitatea acută prin inhalare a acestora pe parcursul unei perioade de expunere de 4 ore. Perioadele de expunere pot varia în funcție de obiectivele de reglementare. Pentru fiecare nivel de concentrație se testează câte trei animale din fiecare sex. În funcție de mortalitatea și/sau starea muribundă a animalelor, pot fi suficiente două etape pentru a determina toxicitatea acută a substanței chimice testate. Dacă există indicii că animalele de un anumit sex sunt mai susceptibile decât celălalt sex, testul poate continua numai pe animalele susceptibile. Rezultatele obținute în etapa anterioară vor determina etapa următoare și anume:
  - (a) nu mai sunt necesare teste suplimentare;
  - (b) se testează câte trei animale din fiecare sex; sau
  - (c) se testează numai 6 animale având sexul care s-a dovedit a fi cel mai sensibil, adică estimările limitei inferioare ale clasei de toxicitate ar trebui să se bazeze pe șase animale din fiecare grup de testare a concentrației, indiferent de sex.
7. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită ar trebui eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor în aceeași măsură cu animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau care suferă profund și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (7).

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

8. Ar trebui utilizate animale adulte, tinere, sănătoase provenind din sușele utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul, iar orice utilizare a unei specii diferite ar trebui justificată.

**Pregătirea animalelor**

9. Femelele ar trebui să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua expunerii, animalele ar trebui să fie adulte, cu vârsta cuprinsă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea corporală ar trebui să se situeze în limita a  $\pm 20\%$  din greutatea medie a animalelor de ambele sexe expuse anterior la aceeași vârstă. Animalele se selectează aleatoriu și se marchează pentru a putea fi identificate individual. Animalele sunt ținute în cuști timp de minimum cinci zile înainte de începerea testului, pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator. De asemenea, animalele ar trebui obișnuite cu dispozitivele de testare cu puțin timp înainte de testare, deoarece aceasta va atenua stresul provocat de introducerea în noul mediu.

**Creșterea animalelor**

10. Temperatura spațiului în care sunt ținute animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Umiditatea relativă ar trebui menținută în intervalul optim de 30-70 %, deși acest lucru ar putea să nu fie posibil atunci când vehiculul utilizat este apa. În general, înainte și după expunerii, animalele ar trebui să fie închise în cuști, în grupuri de același sex și cu aceeași concentrație, însă numărul de animale din cușcă ar trebui selectat astfel să permită observarea ușoară a fiecărui exemplar și să reducă la minim pierderile provocate de canibalism și luptele dintre animale. Atunci când animalele urmează a fi expuse numai în zona nasului, poate fi necesară aclimatizarea lor prealabilă cu tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu ar trebui să provoace stres fizic, termic sau



▼ **M4**

de imobilizare asupra animalelor. Dispozitivele de imobilizare pot afecta date fiziologice finale, cum sunt temperatura corporală (hipertermie) și/sau volumul respirator pe minut. Dacă sunt disponibile date generice care demonstrează că nu apar modificări semnificative de acest tip, pre-aclimatizarea cu tuburile de imobilizare nu este necesară. Animalele expuse cu întregul corp la un aerosol ar trebui să fie adăpostite individual pe durata expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolilor testați prin blana celorlalte animale din cușcă. Se poate utiliza hrană convențională și certificată de laborator, cu excepția perioadelor de expunere, însoțită de asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut de la rețeaua publică. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric.

**Incintele de inhalare**

11. Incintele de inhalare ar trebui să fie selectate în funcție de natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul preferat de expunere este numai în zona nasului (termen care include expunerea numai în zona „a capului”, „a nasului” sau „a botului”). Expunerea numai în zona nasului este în general preferată în studiile cu expunere la aerosoli lichizi sau solizi sau la vapori care se pot condensa și forma aerosoli. Unele obiective speciale ale studiului pot fi atinse mai eficient prin expunerea întregului corp, dar această metodă ar trebui să fie justificată în raportul studiului. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incinta pentru expunere a întregului corp, volumul total al animalelor utilizate în scopuri experimentale nu ar trebui să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere exclusiv în zona nasului și a întregului corp și avantajele și dezavantajele specifice ale acestora sunt descrise în Ghidul 39 (8).

**CONDIȚII DE EXPUNERE****Administrarea concentrațiilor**

12. Perioada recomandată de expunere este de patru ore, fără a include perioada de echilibrare. Pentru satisfacerea anumitor cerințe poate fi necesară utilizarea unor perioade diferite, totuși acestea ar trebui să fie justificate în raportul studiului [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Animalele expuse în incintele pentru expunerea întregului corp ar trebui adăpostite individual, pentru a preveni ingestia substanței chimice testate în urma toaletării celorlalte animale din aceeași cușcă. Animalele nu ar trebui să fie hrănite pe perioada de expunere a întregului corp. Apa poate fi furnizată pe tot parcursul expunerii întregului corp.
13. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică a care urmează a fi testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația selectată și/sau de forma fizică cea mai probabilă din timpul manipulării și utilizării acesteia. Substanțele chimice testate higroscopice și reactive din punct de vedere chimic ar trebui testate în condiții de aer uscat. Ar trebui să se evite generarea unor concentrații cu risc de explozie.

**Distribuția granulometrică**

14. Ar trebui măsurată dimensiunea particulelor pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa și forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor zonelor relevante ale tractului respirator, sunt recomandați aerosoli cu diametre aerodinamice mediane masice ale particulelor (DAMM) cuprins între 1 și 4  $\mu\text{m}$  și cu o abatere geometrică standard ( $\sigma_g$ ) situată intervalul 1,5-3 (8) (13) (14). Deși ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru satisfacerea acestui standard, în cazul în care acesta nu poate fi obținut ar trebui prezentată o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele vaporilor de metale pot avea dimensiuni sub acest standard, în timp ce particulele încărcate, fibrele și materialele higroscopice (a căror dimensiune crește în mediul umed din tractul respirator) pot depăși dimensiunile acestui standard.

**▼ M4****Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul**

15. Este posibilă utilizarea unei vehicul pentru a genera o concentrație și dimensiune a adecvată a particulelor substanței chimice testate în atmosferă. De regulă, vehiculul preferat este apa. Particulele pot fi supuse la procese mecanice pentru a ajunge la distribuția granulometrică necesară, dar ar trebui avut grijă să se evite descompunerea sau modificarea substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au modificat compoziția substanței chimice testate (de exemplu, temperaturi extreme ca urmare a măcinării excesive prin fricțiune), compoziția substanței chimice testate ar trebui verificată analitic. Ar trebui să se acorde atenție deosebită pentru a se evita contaminarea substanței chimice testate. Nu este necesară testarea materialelor granulare nefriabile a căror formulare nu permite inhalarea. Ar trebui realizat un test de măcinare pentru a demonstra că în timpul manipulării materialelor granulare nu se produc particule respirabile. Dacă un test de măcinare produce particule respirabile, ar trebui efectuat un test de toxicitate prin inhalare.

**Animale martor**

16. Nu este necesar un grup paralel de martori negativi (aer). Atunci când pentru generarea atmosferei testului se utilizează un alt vehicul decât apa, ar trebui folosit un grup martor pentru vehicul numai în cazul în care nu sunt disponibile date istorice privind toxicitatea prin inhalare. Dacă un studiu privind toxicitatea unei substanțe chimice testate care a fost introdusă într-un vehicul nu identifică urme de toxicitate, se deduce că vehiculul nu este toxic la concentrația testată; prin urmare, nu este necesar un grup martor pentru vehicul.

**MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE****Alimentarea cu aer a incintei**

17. Debitul de aer în incintă ar trebui să fie controlat cu atenție, monitorizat în mod continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea concentrației (sau stabilității) atmosferei de testare reprezintă o măsură integrală a tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de a controla toți parametrii dinamici relevanți de generare a atmosferei. Ar trebui acordată o deosebită atenție evitării re-inhalării în incintele de inhalare numai în zona nasului, în cazurile în care debitul de aer asigurat de sistemul de expunere este insuficient pentru a asigura un flux dinamic al atmosferei conținând substanța chimică testată. Există metodele indirecte care pot fi utilizate pentru a demonstra lipsa re-inhalării în condițiile de operare selectate (8) (15). Concentrația de oxigen ar trebui să fie de cel puțin 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu ar trebui să depășească 1 %. Dacă există motive să se considere că aceste standarde nu pot fi satisfăcute, concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon ar trebui să fie măsurate.

**Temperatura și umiditatea relativă a incintei**

18. Temperatura incintei se menține la  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor cu expunere numai în zona nasului sau a întregului corp se monitorizează și se înregistrează de cel puțin trei ori, pentru perioadele de expunere de până la patru ore, și o dată pe oră, în cazul perioadelor mai scurte. Umiditatea relativă ar trebui menținută în intervalul optim de 30-70 %, dar un asemenea nivel fi dificil de atins (de exemplu, atunci când se testează amestecuri conținând apă) sau de măsurat, ca urmare a interferențelor dintre substanța chimică testată și metoda de testare.

▼ **M4****Substanța chimică testată: concentrația nominală**

19. Dacă este posibil, concentrația nominală de expunere în incintă ar trebui calculată și înregistrată. Concentrația nominală constă în masa substanței chimice testate generate, împărțită la volumul total de aer care a circulat prin sistemul incintei. Deși concentrația nominală nu este utilizată pentru a caracteriza expunerea animalelor, însă o comparație a acesteia cu concentrația efectivă oferă indicații privind eficiența de generare a sistemului de testare și, astfel, poate fi utilizată pentru a identifica eventualele probleme de generare.

**Substanța chimică testată: concentrația reală**

20. Concentrația efectivă este reprezentată de concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalului din incinta de inhalare. Concentrațiile efective pot fi obținute prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau nespecifice, cum este analiza filtrului gravimetric. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptată numai pentru aerosolii sub formă de pulbere cu o singură componentă sau pentru aerosolii lichidelor cu volatilitate redusă și ar trebui să fie susținută de caracterizări prealabile adecvate specifice pentru substanțele testate. Concentrația aerosolilor sub formă de pulbere cu componente multiple poate fi determinată, de asemenea, prin analiză gravimetrică. Totuși, o astfel de analiză necesită date analitice care să demonstreze că materialul aflat în suspensie aer are aceeași compoziție ca materialul inițial. Dacă aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară o nouă analiză a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer) la intervale regulate pe durata studiului. În cazul agenților transformați în aerosoli care se pot evapora sau pot sublima, ar trebui demonstrat că toate fazele au fost prelevate prin metoda selectată. Concentrațiile țintă, nominale și efective ar trebui indicate în raportul studiului, dar numai concentrațiile efective sunt utilizate pentru a calcula valorile concentrației letale din analizele statistice.
21. Dacă este posibil, se va utiliza un singur lot de substanță chimică testată, iar proba testată ar trebui păstrată în condiții care să îi asigure puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, substanța chimică testată ar trebui să fie caracterizată atât în ceea ce privește puritatea, cât și, în limita posibilităților tehnice, identitatea, cantitățile de contaminații identificate și de impurități. Aceasta poate fi demonstrată de, dar nu se limitează la următoarele date: timpul de retenție și suprafața relativă a vârfului, greutatea moleculară obținută prin analize de spectroscopie de masă sau de cromatografie în fază gazoasă sau prin alte estimări. Chiar dacă laboratorul de testare nu are obligația de a stabili identitatea probei testate, acesta ar trebui să confirme cel puțin parțial caracterizarea oferită de sponsor (de exemplu, culoare, caracteristici fizice etc.).
22. Atmosfera de expunere este menținută la un nivel cât mai constant posibil și monitorizată permanent și/sau intermitent, în funcție de metoda de analiză. Atunci când prelevarea probelor se desfășoară în mod intermitent, ar trebui prelevate probe din atmosfera incintei cel puțin de două ori pe durata unui studiu de patru ore. Dacă acest lucru nu este posibil din cauza debitului limitat de aer sau a nivelului redus al concentrațiilor, se poate preleva o singură probă pentru întreaga perioadă de expunere. În cazul în care apar fluctuații semnificative între probe, următoarele concentrații testate ar trebui să utilizeze patru probe pentru fiecare expunere. Nicio probă a concentrației din incintă nu ar trebui să se abată de la concentrația medie a incintei cu mai mult de  $\pm 10\%$  în cazul gazelor și vaporilor și cu mai mult de  $\pm 20\%$  în cazul aerosolilor lichizi sau solizi. Perioada până la atingerea echilibrului în incintă ( $t_{95}$ ) ar trebui calculată și înregistrată. Durata de expunere cuprinde perioada de generare a substanței chimice testate, inclusiv perioada necesară pentru atingerea  $t_{95}$ . Orientări privind estimarea  $t_{95}$  sunt disponibile în Ghidul 39 (8).

▼ **M4**

23. Fiecare fază a amestecurilor foarte complexe formate din vapori/gaze și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate evacuate din produse/dispozitive specializate finale) poate avea un comportament diferit într-o incintă de inhalare, astfel încât ar trebui selectată cel puțin o substanță-indicator (analit) a fiecărei faze (vapori/gaz și aerosol), de obicei substanța activă principală a amestecului. Atunci când substanța chimică testată constă într-un amestec, concentrația analitică ar trebui raportată pentru amestecul total, nu doar pentru ingredientul activ al componentei (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective sunt disponibile în Ghidul 39 (8).

**Substanța chimică testată: distribuția granulometrică**

24. Distribuția granulometrică a aerosolilor ar trebui să fie determinată de cel puțin două ori în timpul fiecărei durate de expunere de patru ore, cu ajutorul unui impactor în cascadă sau a unui instrument alternativ, cum ar fi un separator de particule aerodinamice. Dacă echivalența rezultatelor obținute cu ajutorul impactorului în cascadă sau a instrumentului alternativ poate fi demonstrată, instrumentul alternativ poate fi utilizat pe durata întregului studiu. Eficiența de colectare a instrumentului principal poate fi confirmată prin utilizarea în paralel cu un al doilea dispozitiv, precum un filtru gravimetric sau un impactor/barbotor de gaze. Concentrația masică obținută prin analiza dimensiunii particulelor ar trebui să difere într-o marjă rezonabilă de limitele concentrațiilor masice obținute prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Dacă echivalența poate fi demonstrată încă din primele etape ale studiului, măsurările de confirmare suplimentare pot fi omise. Din motive de protecție a bunăstării animalelor, se vor lua măsuri pentru a reduce la minimum cantitatea de date neconcludente care poate obliga la repetarea expunerii. Determinarea dimensiunii particulelor ar trebui realizată pentru vapori atunci când condensarea acestora poate conduce la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule într-o atmosferă de vapori cu potențial de amestec al fazelor (a se vedea punctul 14).

**PROCEDURĂ****Testul principal**

25. În fiecare etapă se utilizează trei animale de fiecare sex sau șase animale având sexul care s-a dovedit cel mai sensibil. Dacă speciile de rozătoare, altele decât șobolanii, sunt expuse numai în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi modificate pentru a reduce la minimum nivelurile de suferință specifice speciei. Nivelul concentrației primei doze se selectează din cele patru niveluri fixate și ar trebui să fie cel mai sensibil să producă toxicitate la unele din animalele expuse. Schemele de testare pentru gaze, vapori și aerosoli (incluse în apendicele 2-4) reprezintă testele cu valorile limită pentru categoriile CLP 1-4 (9) pentru gaze (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (apendicele 2), pentru vapori (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (apendicele 3) și pentru aerosoli (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (apendicele 4). Categoria 5, care nu este prevăzută în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9), se referă la concentrații care depășesc respectivele concentrații limită. Pentru fiecare concentrație inițială se aplică schema corespunzătoare. În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, se urmează procedura de testare indicată prin săgeți până la stabilirea unei categorii.
26. Intervalul de timp dintre administrarea dozelor la grupurile expuse se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există o certitudine rezonabilă că animalele testate anterior vor supraviețui. Se recomandă un interval de 3 sau 4 zile între expunerile la fiecare nivel de concentrație, pentru a permite observarea toxicității întârziate. Intervalul de timp poate fi adaptat după caz, de exemplu în cazul unor rezultate neconcludente.

▼ **M4****Testul la valori-limită**

27. Testul la valori-limită se utilizează atunci când substanța chimică testată este cunoscută sau considerată ca fiind practic netoxică, adică atunci când are efecte toxice numai la o concentrație peste limita reglementată. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate pot fi obținute pe baza datelor cunoscute despre substanțe și amestecuri similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că substanța chimică testată este toxică, se efectuează testul principal [orientări suplimentare sunt disponibile în Ghidul 39 (8)].
28. Când se utilizează procedura normală, trei animale pentru fiecare sex sau șase animale de sexul dovedit cel mai sensibil sunt expuse la concentrații de 20 000 ppm pentru gaze, 20 mg/l pentru vapori și 5 mg/l pentru pulberi/aburi (dacă este posibil), care reprezintă valorile limită ale acestei metode de testare. În cazul testării aerosolilor, principalul obiectiv ar trebui să fie obținerea unor particule de dimensiuni respirabile (de exemplu, DAMM de 1-4 μm). Acest lucru este posibil pentru majoritatea substanțelor testate la o concentrație de 2 mg/l. Testarea aerosolilor la o valoare peste 2 mg/l ar trebui efectuată numai atunci când pot fi obținute particule de dimensiuni respirabile [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Conform GHS (16), din motive de asigurare a bunăstării animalelor, testarea peste valoarea concentrației-limită nu este recomandată. Testarea în categoria GHS 5 (16), care nu este prevăzută în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9), ar trebui să fie luată în considerare doar atunci când este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie de interes direct pentru protecția sănătății oamenilor și animalelor și ar trebui să fie justificată în raportul studiului. În cazul substanțelor de test cu risc de explozie, vor fi luate toate măsurile pentru a se evita întrunirea condițiilor favorabile unei explozii. Pentru a evita utilizarea inutilă a animalelor, se va efectua un test prealabil fără animale, anterior testului la valorile limită, pentru a se verifica satisfacerea condițiilor din incintă.

**OBSERVAȚII**

29. Animalele ar trebui observate frecvent din punct de vedere clinic în perioada de expunere. După expunere, observațiile clinice ar trebui efectuate de cel puțin două ori în ziua expunerii sau mai frecvent, în funcție de reacția animalelor la tratament, apoi de cel puțin o dată pe zi, pentru o perioadă totală de 14 zile. Perioada de observație nu este fixă, însă ar trebui determinată în funcție de tipul și momentul apariției semnelor clinice și de durata perioadei de recuperare. Momentele la care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care acestea au tendința de a apărea cu întârziere. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare animal. Din motive de protecție a bunăstării acestora, animalele găsite în stare muribundă și care manifestă dureri mari și/sau semne prelungite de suferință profundă ar trebui eutanasiate. Atunci când se efectuează examinări privind semnele clinice de toxicitate, starea defavorabilă inițială și modificările respiratorii temporare în urma expunerii nu ar trebui să fie confundate cu efectele tratamentului. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în ghidul privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (7). În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

▼ **M4**

30. Observațiile asupra animalelor din cuști vizează modificările blănii și pielii, ochilor și mucoaselor, membranelor și, de asemenea, ale sistemelor respirator, circulator, vegetativ și nervos central, precum și ale activității somato-motorii și a comportamentului. Dacă este posibil, se înregistrează fiecare diferență între efectele locale și sistemice. Se va acorda o atenție specială observării tremurăturii, convulsiilor, salivării, diareei, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate oferi indicii de susținere privind bradipneea reflexă sau hipo/hipertermia asociate condițiilor de tratament sau de captivitate.

**Greutatea corporală**

31. Greutatea corporală a fiecărui animal ar trebui să fie înregistrată o dată pe zi pe durata perioadei de aclimatizare, imediat înainte de expunere (ziua 0) și cel puțin în zilele 1, 3 și 7 (apoi săptămânal), precum și în momentul morții sau al eutanasierii, dacă acestea au loc după prima zi. Greutatea corporală este recunoscută ca indicator critic al toxicității, iar animalele care prezintă o scădere susținută de  $\geq 20\%$  comparativ cu valorile anterioare studiului ar trebui să fie atent monitorizate. Animalele care au supraviețuit sunt cântărite și eutanasiate la sfârșitul perioadei de post-expunere.

**Patologia**

32. Toate animalele participante la test, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eutanasiate și eliminate din studiu din motive de protecție a bunăstării animalelor, ar trebui să fie supuse unei autopsii. Dacă autopsia nu poate fi efectuată imediat după descoperirea animalului mort, acesta ar trebui să fie refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile ar trebui efectuate cât mai repede posibil, de obicei în termen de 1-2 zile. Ar trebui înregistrate toate modificările patologice macroscopice intervenite la fiecare animal, fiind acordată o atenție specială modificărilor tractului respirator.
33. Pot fi efectuate examinări suplimentare, incluse *a priori* în proiect, dacă acestea sunt considerate necesare pentru a spori valoarea interpretativă a studiului, cum sunt cântărirea plămânilor șobolanilor supraviețuitori și/sau identificarea iritațiilor prin examinare microscopică a tractului respirator. Organele examinate le pot include pe cele care prezintă semne de modificări patologice macroscopice, provenite de la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore, precum și organele despre care se știe sau se consideră că au fost afectate. Examinarea microscopică a întregului tract respirator poate furniza informații utile privind substanțele chimice care produc reacții la contactul cu apa, cum sunt acizii și substanțele higroscopice.

**DATE ȘI RAPORT****Date**

34. Ar trebui furnizate date privind greutatea corporală și rezultatele autopsiei fiecărui animal. Observațiile clinice se rezumă în format tabelar, indicând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere și evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și rezultatele autopsiei.

**▼ M4****Raportul de testare**

35. Raportul de testare ar trebui să includă următoarele informații, după caz:

*Animalele testate și îngrijirea lor*

- descrierea condițiilor de captivitate, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) animalelor din fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de expunere la lumină și alimentația;
- specia/sușa utilizată și justificarea utilizării altor specii decât șobolanul;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- metoda de repartizare aleatorie;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa de alimentație, sursa de apă);
- descrierea tuturor condițiilor anterioare testului, inclusiv alimentație, carantină și tratarea unor boli.

*Substanța chimică testată*

- natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);
- datele de identificare și numărul din registrul Chemical Abstract Service (CAS), dacă este cunoscut.

*Vehiculul*

- justificarea utilizării unui vehicul și a vehiculului ales (dacă este altul decât apa);
- date istorice și de confirmare care demonstrează că vehiculul nu afectează rezultatul studiului.

*Incinta de inhalare*

- descrierea incintei de inhalare, inclusiv dimensiunile și volumul acesteia;
- sursa și descrierea echipamentului utilizat pentru expunerea animalelor, precum și pentru generarea atmosferei;
- echipamentele de măsurare a temperaturii, umidității, dimensiunii particulelor și concentrației efective;
- sursa de aer, modul de tratare a aerului introdus/extras și sistemul de condiționare;
- metodele utilizate pentru calibrarea echipamentelor pentru asigurarea unei atmosfere omogene de testare;
- diferențele de presiune (pozitive sau negative);
- orificiile de expunere ale incintei (pentru expunere la nivelul nasului); locul animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);
- omogenitatea temporală/stabilitatea atmosferei de testare;
- amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;
- debitele de aer, debitul de aer/orificiul de expunere (pentru expunere la nivelul nasului) sau greutatea animalului/incintă (pentru expunerea întregului corp);
- informații privind aparatele de măsurare a nivelului de oxigen și dioxid de carbon, după caz;

**▼ M4**

- perioada necesară pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare ( $t_{95}$ );
- numărul modificărilor de volum pe oră;
- dispozitivele de contorizare (după caz).

*Date privind expunerea*

- justificarea concentrației țintă selectată pentru studiul principal;
- concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul total de aer care a circulat prin incintă);
- concentrațiile efective ale substanței chimice testate care au fost prelevate din zona de respirație a animalelor; în cazul amestecurilor testate care produc forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), acestea pot fi analizate separat;
- toate concentrațiile în aer ar trebui raportate separat, în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m<sup>3</sup> etc.), iar unitățile de volum (de exemplu, ppm, ppb) pot fi indicate și între paranteze;
- distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea geometrică standard ( $\sigma_g$ ), inclusiv metodele de calcul ale acestora. analizele granulometrice individuale ar trebui să fie raportate.

*Condițiile de testare*

- detalii privind preparatul substanței chimice testate, inclusiv detalii referitoare la orice procedură utilizată pentru reducerea dimensiunii particulelor substanțelor solide sau prepararea soluțiilor substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au modificat compoziția substanței chimice testate, se includ rezultatele analizelor de verificare a acesteia;
- o descriere (preferabil însoțită de o diagramă) a echipamentului utilizat pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la aceasta;
- detalii privind metoda de chimie analitică utilizată și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);
- justificarea selectării concentrațiilor testate.

*Rezultate*

- prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer din incintă;
- prezentarea sub formă tabelară a concentrației nominale și efective din incintă;
- prezentarea sub formă tabelară a dimensiunii particulelor, inclusiv date analitice privind prelevarea probelor, distribuția granulometrică și calculele DAMM și  $\sigma_g$ ;
- prezentarea sub formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul concentrației la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);
- greutatea corporală a fiecărui animal în perioada studiului, data și ora morții, dacă aceasta are loc anterior eutanasierii; apariția și evoluția semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;



**▼ M4**

- rezultatele autopsiei și ale examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;
- categoria CLP și valoarea limită CL<sub>50</sub>.

*Discutarea și interpretarea rezultatelor*

- ar trebui să se pună un accent deosebit asupra descrierii metodelor utilizate pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația limită sau dimensiunea particulelor;
- ar trebui tratată respirabilitatea particulelor în contextul rezultatelor generale, în special atunci când criteriile privind dimensiunile particulelor nu au putut fi satisfăcute;
- consecvența metodelor utilizate pentru determinarea concentrațiilor nominale și efective și relația dintre concentrația efectivă și concentrația nominală ar trebui incluse în evaluarea generală a studiului;
- ar trebui tratată cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);
- eutanasierea animalelor care prezentau semne de durere și suferință gravă și îndelungată ar trebui justificată în conformitate cu criteriile prevăzute de Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (7).

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Capitolul B.2 din prezenta anexă, „Toxicitate acută (administrare prin inhalare)”.
- (2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schlegel E. (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System, Arch. Toxicol. 77: 243-254.
- (3) Diener W., Kayser D. and Schlegel E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations, Arch. Toxicol. 71: 537-549.
- (4) Diener W. and Schlegel E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC<sub>50</sub> Tests, ALTEX 1: 129-134.
- (5) Capitolul B.1 tris din prezenta anexă, „Toxicitate orală acută – Metoda clasei de toxicitate acută”.
- (6) OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (7) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (9) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

**▼M4**

- (10) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)”.
- (11) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testare pe un model de piele umană”.
- (12) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (13) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2<sup>nd</sup> Edition) Informa Healthcare, New York.
- (14) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT), Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.
- (16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibil la adresa: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_welcome\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html)].

**▼ M4***Apendicele 1*

## DEFINIȚIE

**Substanța chimică testată:** Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

**▼ M4***Apendicele 2***Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru gaze (ppm/4h)**Observații generale <sup>(1)</sup>

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare, astfel cum sunt conținute în prezentul apendice.

Apendicele 2a: concentrația inițială este 100 ppm.

Apendicele 2b: concentrația inițială este 500 ppm.

Apendicele 2c: concentrația inițială este 2 500 ppm.

Apendicele 2d: concentrația inițială este 20 000 ppm.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

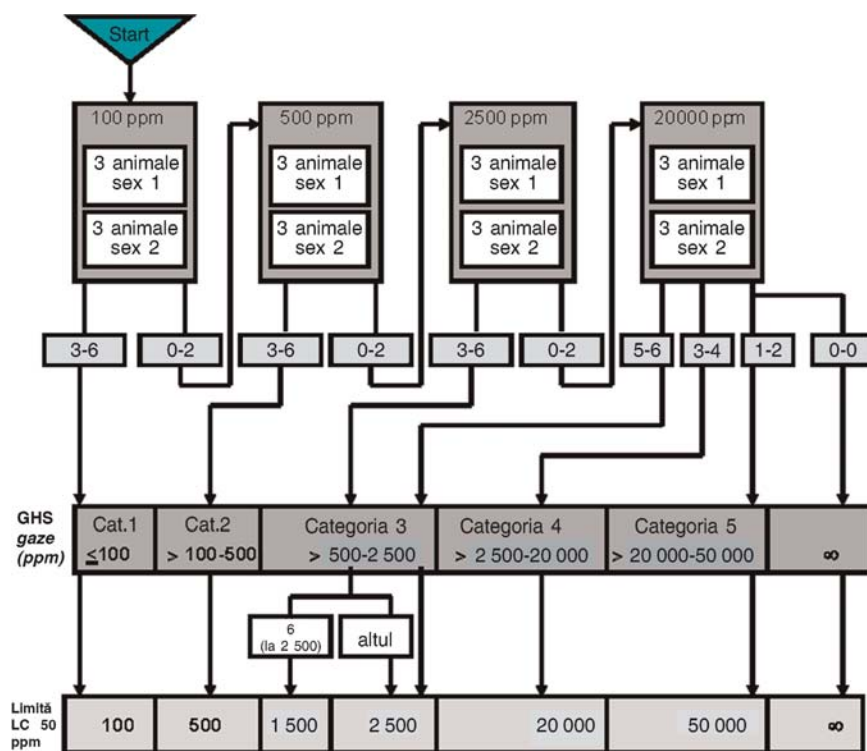
<sup>(1)</sup> În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul Toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼ **M4**

## Apendicele 2a

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 100 ppm/4 h pentru gaze



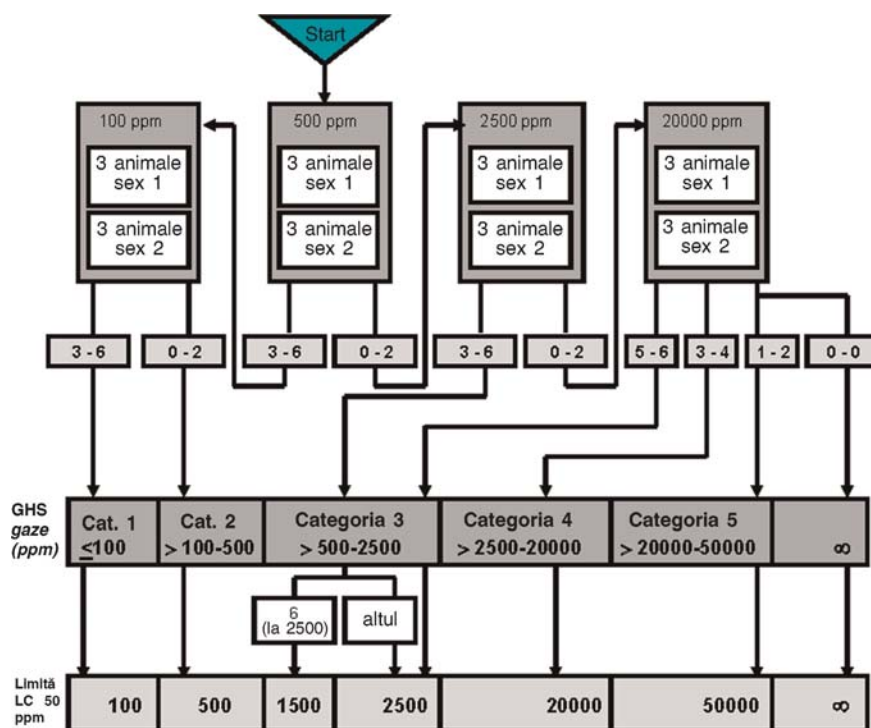
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 2b

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 500 ppm/4h pentru gaze



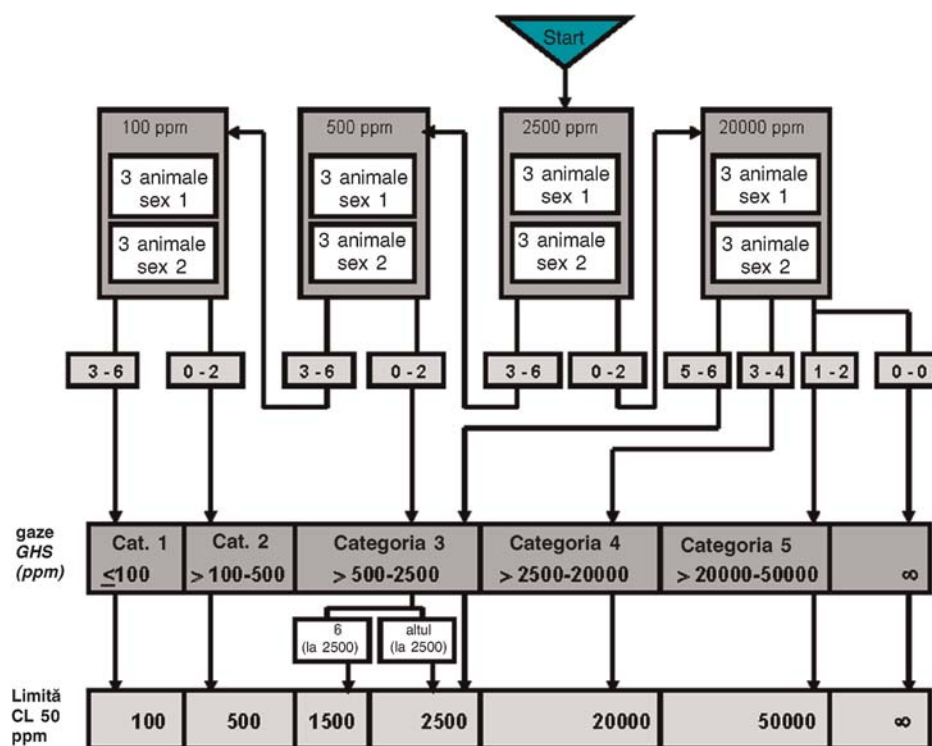
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 2c

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 2 500 ppm/4h pentru gaze



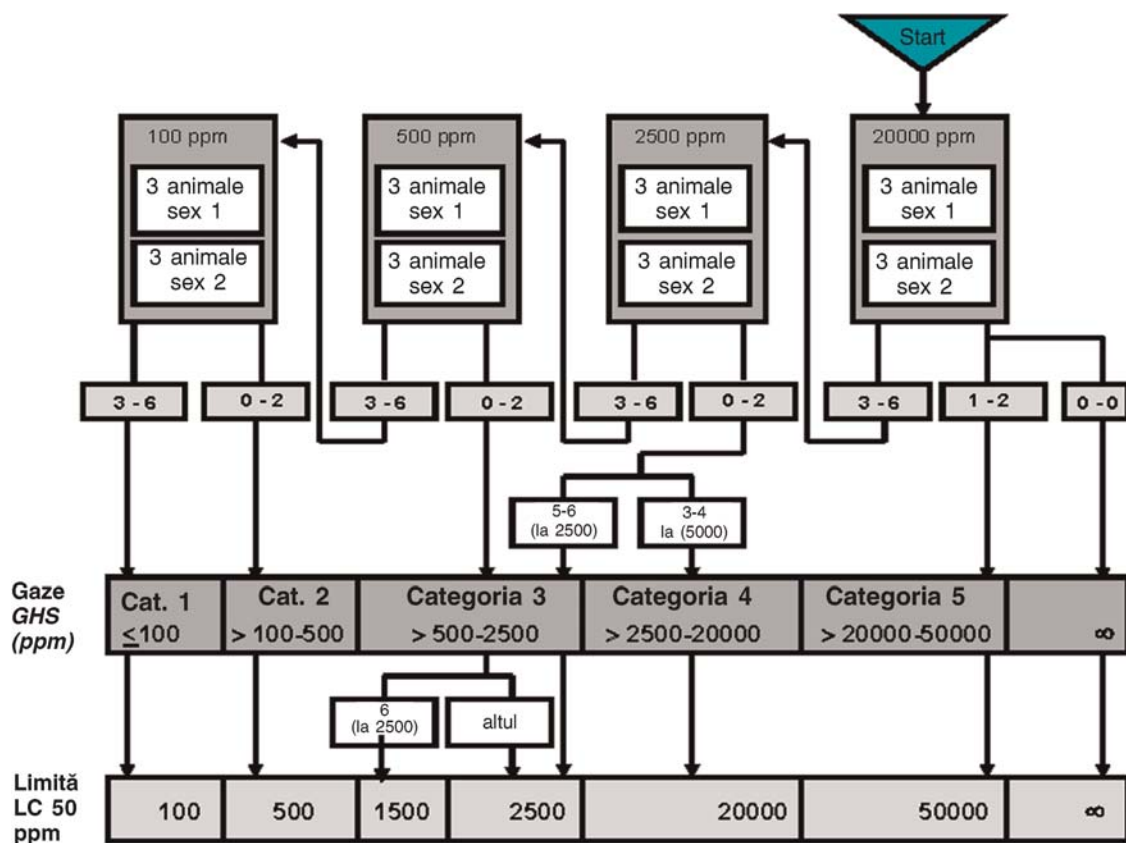
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la  $\geq 20\,000$  ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 2d

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 20 000 ppm/4h pentru gaze



- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- $\infty$ : neclasificat
- Testare la  $\geq 20\,000$  ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)



**▼ M4***Apendicele 3***Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru vapori (mg/L/4h)**Observații generale <sup>(1)</sup>

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare conținute în prezentul apendice.

Apendicele 3a: concentrația inițială este 0,5 mg/l.

Apendicele 3b: concentrația inițială este 2 mg/l.

Apendicele 3c: concentrația inițială este 10 mg/l.

Apendicele 3d: concentrația inițială este 20 mg/l.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

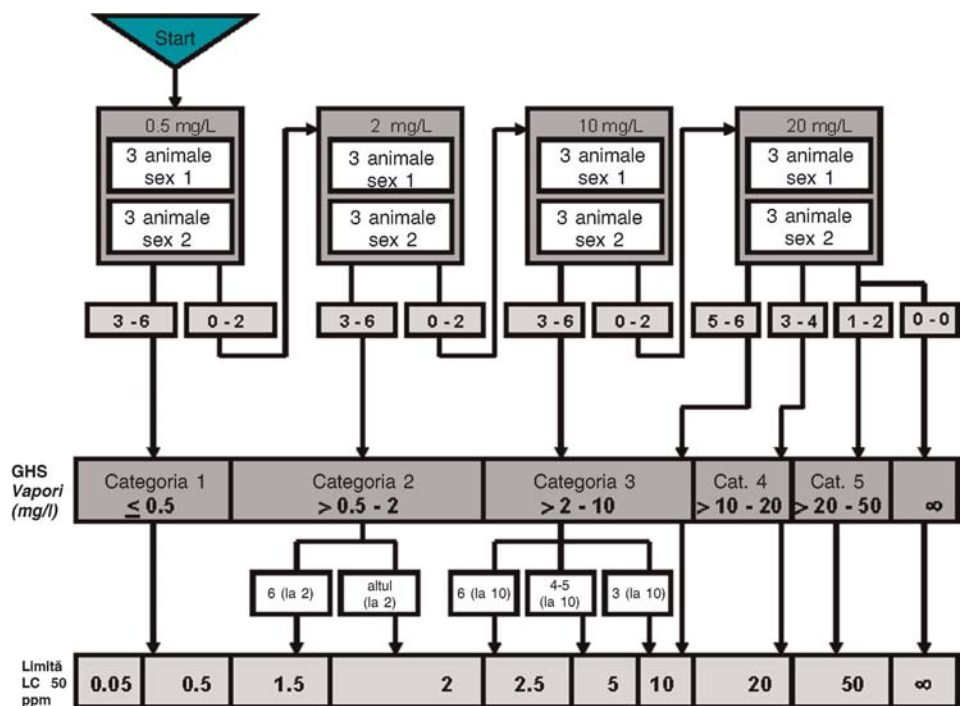
<sup>(1)</sup> În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul Toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼ **M4**

## Apendicele 3a

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,5 mg/l/4h pentru vapori



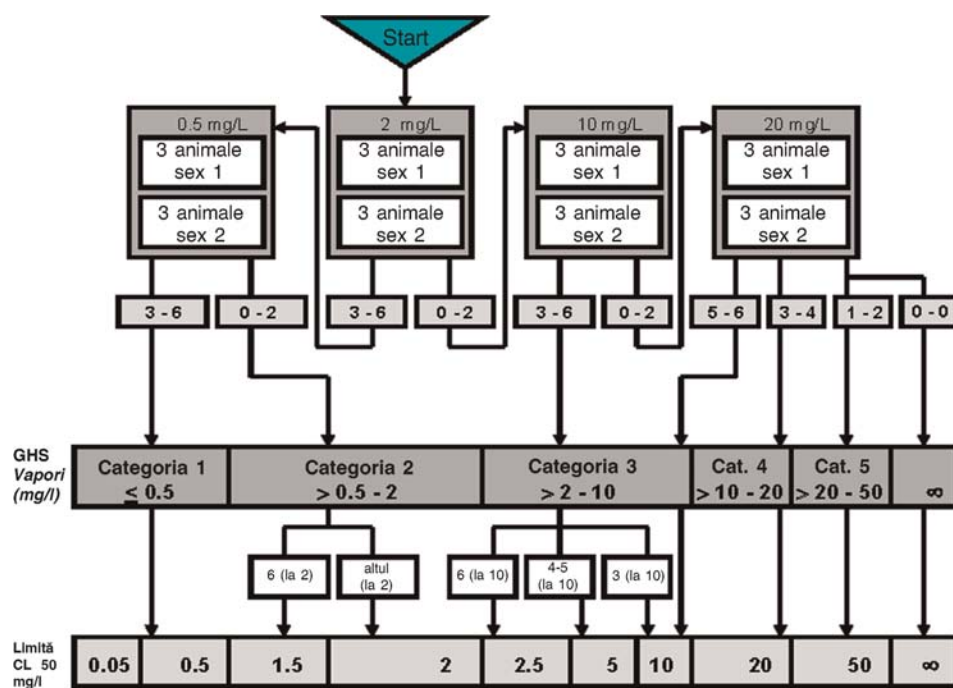
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- $\infty$ : neclasificat
- Testare la 50 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 3b

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 2 mg/l/4h pentru vapori



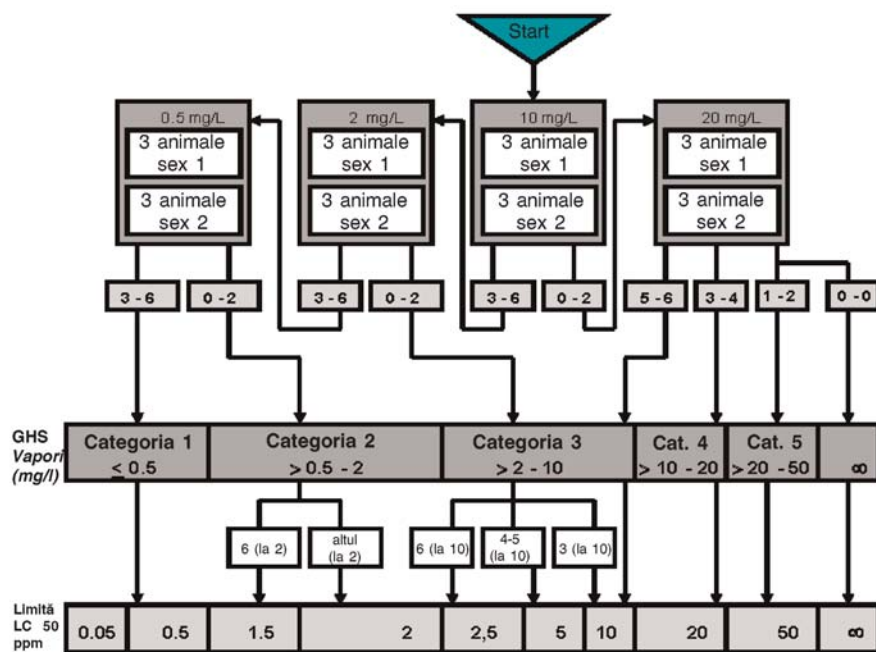
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 50 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 3c

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 10 mg/l/4h pentru vapori



- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 50 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

### Toxicitate acută prin inhalare

**Flowchart for the determination of the GHS hazard category for vapors:**

- Start** (Triangle)
- Concentration Ranges (mg/L):**
  - 0.5 mg/L: 3 animale sex 1, 3 animale sex 2
  - 2 mg/L: 3 animale sex 1, 3 animale sex 2
  - 10 mg/L: 3 animale sex 1, 3 animale sex 2
  - 20 mg/L: 3 animale sex 1, 3 animale sex 2
- Flowchart Logic:**
  - From 0.5 mg/L: 3-6 leads to Category 1; 0-2 leads to Category 2.
  - From 2 mg/L: 3-6 leads to Category 2; 0-2 leads to Category 2.
  - From 10 mg/L: 3-6 leads to Category 3; 0-2 leads to Category 3.
  - From 20 mg/L: 3-6 leads to Category 4; 1-2 leads to Category 5; 0-0 leads to Category 5.
- Categories and Limit Values (CL 50 ppm):**
  - Category 1 ( $\leq 0.5$ ):** Limit Value: 0.05
  - Category 2 ( $> 0.5 - 2$ ):**
    - 6 (la 2): Limit Value: 1.5
    - altul (la 2): Limit Value: 2
  - Category 3 ( $> 2 - 10$ ):**
    - 6 (la 10): Limit Value: 2.5
    - 4-5 (la 10): Limit Value: 5
    - 3 (la 10): Limit Value: 10
  - Cat. 4 ( $> 10 - 20$ ):** Limit Value: 20
  - Cat. 5 ( $> 20 - 50$ ):** Limit Value: 50
  - Category 6 ( $\infty$ ):** Limit Value:  $\infty$

- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 50 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

**▼ M4***Apendicele 4***Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru aerosoli (mg/L/4h)**Observații generale <sup>(1)</sup>

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare conținute în prezentul apendice.

Apendicele 4a: concentrația inițială este 0,05 mg/l.

Apendicele 4b: concentrația inițială este 0,5 mg/l.

Apendicele 4c: concentrația inițială este 1 mg/l.

Apendicele 4d: concentrația inițială este 5 mg/l.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

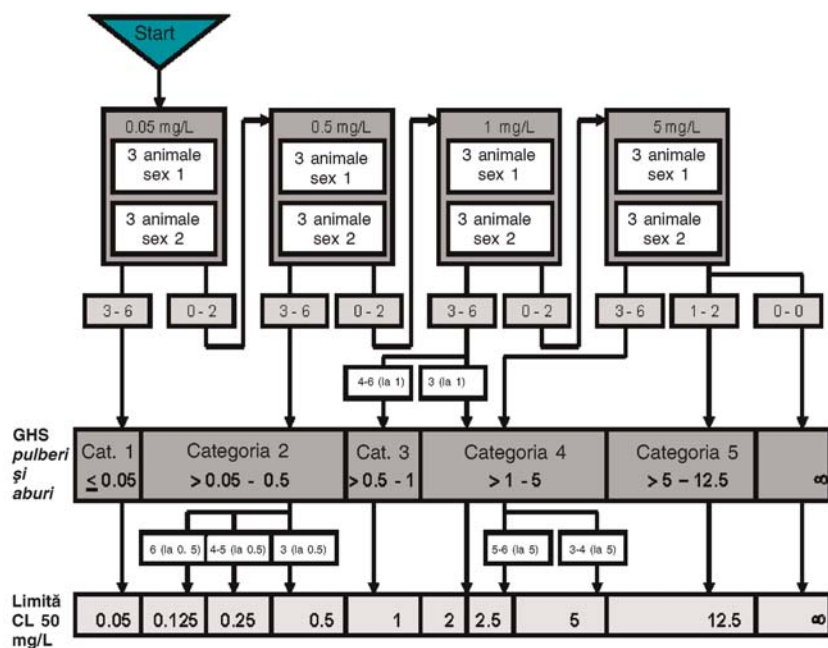
<sup>(1)</sup> În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼ **M4**

## Apendicele 4a

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,05 mg/l/4h  
pentru vapori



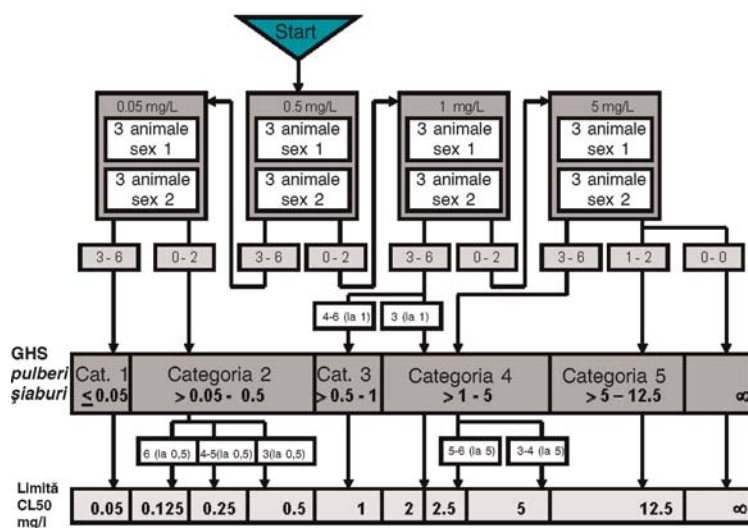
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai sensibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 4b

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,5 mg/l/4h pentru aerosoli



- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

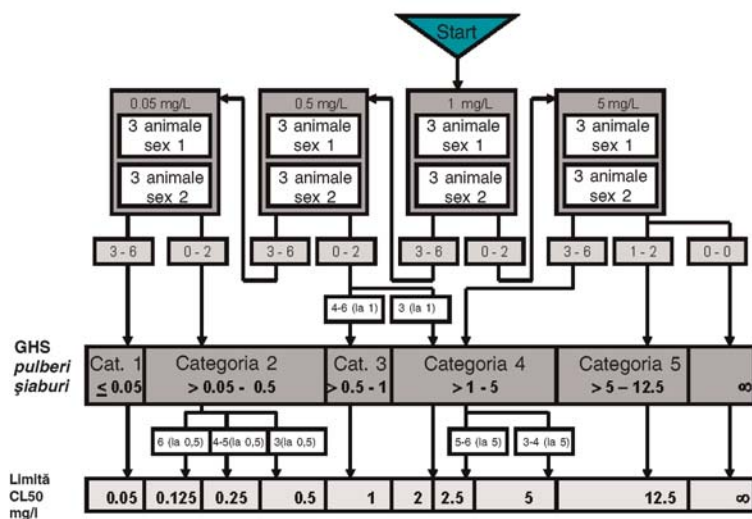


▼ **M4**

## Apendicele 4c

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 1 mg/4h pentru aerosoil



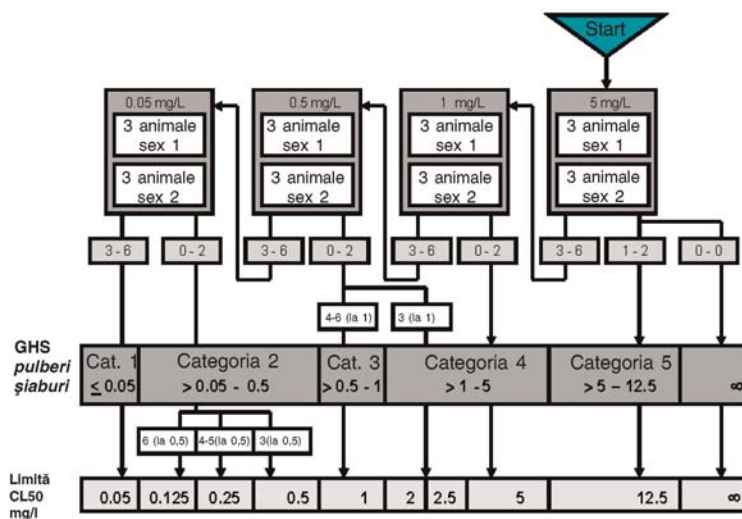
- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai sensibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- $\infty$ : neclasificat
- Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼ **M4**

## Apendicele 4d

## Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 5 mg/l/4h pentru aerosoli



- 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
- 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
- GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
- ∞: neclasificat
- Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)"

## ▼ M5

## B.53. STUDIU DE NEUROTOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 426 privind testarea (2007). În iunie 1995, la Copenhaga, un grup de lucru al OCDE privind toxicitatea pentru reproducere și dezvoltare a discutat despre necesitatea actualizării orientărilor OCDE existente privind testarea toxicității pentru reproducere și dezvoltare și despre elaborarea de noi orientări pentru obiectivele care nu sunt încă reglementate (1). Grupul de lucru a recomandat elaborarea unor orientări privind testarea în domeniul neurotoxicității pentru dezvoltare pe baza unei orientări US EPA, care a fost ulterior revizuită (2). În iunie 1996, la Copenhaga a fost organizată o a doua reuniune de consultare pentru a oferi secretariatului îndrumare cu privire la elaborarea unor noi orientări privind testarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv elementele principale, de exemplu, detalii cu privire la alegerea speciilor de animale, perioada de dozare, perioada de testare, parametrii care trebuie să fie evaluați, precum și criteriile pentru evaluarea rezultatelor. În 1998 s-a publicat o orientare americană privind evaluarea riscurilor de neurotoxicitate (3). În octombrie 2000 au avut loc concomitent o reuniune consultativă a experților OCDE și un atelier al Institutului de științe privind riscurile al ILSI, iar în 2005 s-a organizat la Tokyo o reuniune consultativă a experților. Reuniunile au fost organizate pentru a discuta aspecte științifice și tehnice legate de actualele orientări privind testarea, iar recomandările formulate în urma reuniunilor (4) (5) (6) (7) au fost luate în considerare în elaborarea prezentei metode de testare. În documentele de orientare OCDE nr. 43 privind „Evaluarea și testele de toxicitate pentru reproducere” (8) și nr. 20 privind „Testele de neurotoxicitate” se pot consulta informații suplimentare cu privire la efectuarea, interpretarea și terminologia utilizată pentru prezenta metodă de testare (9).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

2. Există o serie de produse chimice despre care se știe că produc efecte neurotoxice pentru dezvoltare la oameni și la alte specii (10) (11) (12) (13). Pentru a analiza și a evalua caracteristicile toxice ale unui produs chimic, poate fi necesară determinarea potențialului de neurotoxicitate pentru dezvoltare. Studiile privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare sunt concepute pentru a oferi date, inclusiv caracterizări ale relației doză-răspuns, cu privire la potențialele efecte funcționale și morfologice asupra dezvoltării sistemului nervos al descendenților care ar putea rezulta din expunerea intrauterină și la începutul vieții.
3. Un studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare poate fi realizat ca studiu separat, poate fi încorporat într-un studiu privind toxicitatea asupra reproducerii și/sau neurotoxicitatea asupra adulților [de exemplu, metodele de testare B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)] sau poate fi adăugat la un studiu privind toxicitatea asupra dezvoltării prenatale [de exemplu, metoda de testare B.31 (17)]. În cazul în care un studiu privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării este încorporat într-un alt studiu sau atașat la acesta, este necesar să se păstreze integritatea ambelor tipuri de studii. Toate testele trebuie să respecte legislația aplicabilă sau orientările guvernamentale și instituționale privind utilizarea animalelor de laborator în cercetare (de exemplu, 18).
4. Laboratorul de testare ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Informațiile vor include identitatea și structura produsului chimic; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* efectuate pe substanța chimică în cauză; datele toxicologice privind substanțele chimice înrudite structural; și utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) ale substanței chimice. Astfel de informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și vor contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

▼ **M5****PRINCIPIUL TESTULUI**

5. Substanța de testat se administrează animalelor în timpul gestației și alăptării. Femelele sunt testate pentru a evalua efectele la femelele gestante și în perioada lactației și pot, de asemenea, să ofere informații comparative (femele vs. pui). Puii sunt selectați aleatoriu dintre toți puii pentru evaluarea neurotoxicității. Evaluarea constă în observații pentru a detecta tulburările neurologice și de comportament globale, inclusiv evaluarea dezvoltării fizice, a ontogenezei comportamentului, a activității motorii, a funcției motorii și senzoriale și a învățării și memoriei; precum și evaluarea greutății și neuropatologiei creierului în timpul dezvoltării postnatale și la maturitate.
  
6. În cazul în care metoda de testare se aplică independent, animalele suplimentare disponibile din fiecare grup ar putea fi utilizate pentru anumite proceduri neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice care să completeze datele obținute din examinările recomandate de prezenta metodă de testare (16) (19) (20) (21). Procedurile suplimentare pot fi deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice, efectele anticipate sau mecanismul/modul de acțiune sugerează un anumit tip de neurotoxicitate. Examinările suplimentare pot fi utilizate atât în cazul femelelor, cât și în cazul puilor. De asemenea, se pot utiliza proceduri *ex vivo* sau *in vitro*, atât timp cât astfel de proceduri nu modifică integritatea procedurilor *in vivo*.

**PREGĂTIRI PENTRU TESTE****Selectarea speciei de animale**

7. Specia preferată pentru test este șobolanul; alte specii pot fi utilizate atunci când este cazul. De reținut, cu toate acestea, că zilele de gestație și după fătare specificate în prezenta metodă de testare sunt proprii pentru speciile de șobolani utilizate în mod obișnuit, iar în cazul în care se utilizează o specie diferită sau o sușă neobișnuită, se selectează zile comparabile. Utilizarea unei alte specii trebuie justificată pe bază de date toxicologice, farmacocinetice și/sau alte date. Justificarea va include disponibilitatea unor evaluări postnatale neurocomportamentale și neuropatologice specifice speciei. Dacă a existat un test anterior care a pus probleme, trebuie să se țină cont de specia/sușa pentru care s-au exprimat preocupări. Date fiind atributele de performanță diferite ale diverselor sușe de șobolani, trebuie să existe dovezi că sușa selectată în vederea utilizării are un nivel adecvat de fertilitate și de capacitate de reacție. Trebuie să se documenteze fiabilitatea și sensibilitatea altor specii pentru a detecta neurotoxicitatea asupra dezvoltării.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

8. Se recomandă ca temperatura încăperii în care se află animalele utilizate pentru experimente să fie de  $22 \pm 3$  °C. Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și de preferat să nu depășească 70 %, exceptând operațiunile de curățare a sălii, ar trebui menținută o umiditate de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. De asemenea, este posibil să se inverseze ciclul de lumină înainte de împerechere și pe durata studiului, pentru efectuarea evaluărilor parametrilor funcționali și de comportament în timpul perioadei de întuneric (în condiții de lumină roșie), și anume, în perioada în care animalele sunt în mod normal active (22). Orice modificări ale ciclului lumină-întuneric trebuie să cuprindă o perioadă de aclimatizare pentru a permite animalelor să se adapteze la noul ciclu. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Se raportează tipul de alimente și de apă și ambele trebuie să fie analizate pentru contaminanți.

## ▼ M5

9. Animalele pot fi adăpostite individual sau în cuști în grupuri mici de același sex. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. După constatarea copulației sau nu mai târziu de ziua 15 de gestație, animalele împerecheate se plasează în cuști speciale de fătare sau de maternitate. Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea acestora să fie reduse la minimum. Femelelor împerecheate li se oferă materiale adecvate și determinate pentru construirea cuibului atunci când se apropie momentul fătării. Este bine cunoscut faptul că manipularea inadecvată și stresul în timpul sarcinii pot conduce la rezultate negative, inclusiv pierderi de sarcină și dezvoltare fetală și postnatală modificată. Pentru a evita pierderea fătului din cauza unor factori care nu sunt corelați cu tratamentul, animalele se manipulează cu grijă în timpul sarcinii și se evită stresul cauzat de factori externi, cum ar fi zgomotul exterior excesiv.

**Pregătirea animalelor**

10. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator și care nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare, cu excepția cazului în care studiul este încorporat într-un alt studiu (a se vedea punctul 3). Animalele de experiență sunt descrise precizând specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic, cu care este marcat. Se recomandă ca animalele din toate grupurile testate să aibă, pe cât posibil, greutate și vârste apropiate și trebuie să se situeze în intervalul normal de specie și sușă aflate în studiu. La fiecare nivel al dozei se utilizează femele adulte tinere, nulipare. Nu se împerechează animale consangvine, o atenție deosebită trebuind acordată pentru a garanta acest lucru. Ziua 0 de gestație este ziua în care se observă un dop vaginal și/sau spermă. Atunci când se achiziționează animale gestante de la un furnizor, se acordă timp suficient pentru aclimatizare (de exemplu, 2-3 zile). Femelele se distribuie aleatoriu în grupurile martor și de tratament și, pe cât posibil, acestea ar trebui să fie distribuite uniform în toate grupurile (de exemplu, se recomandă o procedură aleatorie stratificată pentru a asigura o distribuție uniformă în toate grupurile, cum ar fi cea în funcție de greutatea corporală). Femelele inseminate de același mascul se distribuie în mod egal în toate grupurile.

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

11. Fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de femele gestante care să fie expuse la produsul chimic testat pentru a se asigura că se produce un număr adecvat de descendenți pentru evaluarea neurotoxicității. Pentru fiecare nivel de doză se recomandă un total de 20 de cuiburi. Modelele de dozare duplicate și fragmentată de grup sunt permise în cazul în care se atinge numărul total de cuiburi pentru fiecare grup și se utilizează modele statistice adecvate pentru lua în considerare duplicatele.
12. În sau înainte de ziua 4 după fătare (*postnatal day*, PND) (ziua de fătare este PND 0), dimensiunea fiecărui cuib se ajustează eliminând surplusul de pui în mod aleatoriu pentru a obține o dimensiune uniformă a cuibului pentru toate cuiburile (23). Dimensiunea cuibului nu depășește mărimea medie a cuibului pentru sușa de rozătoare utilizate (8-12). Cuibul cuprinde, în cea mai mare măsură posibil, un număr egal de pui masculi și femele. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale, nu este adecvată. După standardizarea cuiburilor (sacrificare) și înainte de testarea în continuare a parametrilor funcționali, puii individuali care sunt programați pentru testare înainte de înțărare sau după înțărare trebuie să fie identificați în mod unic, utilizând orice metodă adecvată cu suferințe minime pentru identificarea puilor (de exemplu, 24).

## ▼ M5

**Repartizarea animalelor pentru teste funcționale și de comportament, greutate și evaluări neuropatologice**

13. Metoda de testare permite abordări diferite cu privire la repartizarea animalelor expuse intrauterin și în perioada de alăptare pentru teste funcționale și de comportament, maturizare sexuală, determinarea greutății creierului și evaluare neuropatologică (25). Alte teste privind funcția neuro-comportamentală (de exemplu, comportamentul social), neurochimia sau neuropatologia pot fi adăugate de la caz la caz, atât timp cât nu se compromise integritatea testelor necesare inițial.
14. Sunt selectați pui din fiecare grup tratat și sunt repartizați pentru evaluările obiectivelor în sau după PND 4. Selecția puilor se efectuează astfel încât, în măsura posibilului, ambele sexe din fiecare cuib din fiecare grup tratat să fie reprezentate în mod egal în toate testele. Pentru testarea activității motorii, aceeași pereche de pui masculi și femele se testează la fiecare vârstă înainte de înțărare (a se vedea punctul 35). Pentru toate celelalte teste, aceeași pereche sau perechi separate de masculi și de femele pot fi repartizate pentru diferite teste de comportament. Ar putea fi necesar să se repartizeze pui diferiți pentru testele pe pui înțărcați vs. adulți ale funcției cognitive pentru a evita confuzia efectelor vârstei și ale dresajului prealabil asupra măsurătorilor (26) (27). La înțărare (PND 21), puii care nu au fost selectați pentru testare pot fi eutanasiați. Se raportează orice modificări ale repartizării puilor. Unitatea statistică de măsură ar trebui să fie cuibul (sau femela), nu și puilul.
15. Există diferite modalități de repartizare a puilor pentru examinarea înainte de înțărare și după înțărare, teste cognitive, examene patologice etc. (a se vedea figura 1 pentru conceptul general și anexa 1 pentru exemple de repartizare). Numărul minim de animale recomandat în fiecare grup tratat și pentru examinările înainte de înțărare și după înțărare este după cum urmează:

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Observații clinice și greutate corporală                     | Toate animalele                |
| Observații clinice detaliate                                 | 20/sex (1/sex/cuib)            |
| Greutatea creierului (după fixare) PND 11-22                 | 10/sex (1/cuib)                |
| Greutatea creierului (nefixat) ~ PND 70                      | 10/sex (1/cuib)                |
| Neuropatologie (fixare prin imersie sau perfuzare) PND 11-22 | 10/sex (1/cuib)                |
| Neuropatologie (fixare prin perfuzare) ~ PND 70              | 10/sex (1/cuib)                |
| Maturizare sexuală   | 20/sex (1/sex/cuib)            |
| Alte repere de dezvoltare (opțional)                         | Toate animalele                |
| Ontogeneza comportamentului                                  | 20/sex (1/sex/cuib)            |
| Activitatea motorie  | 20/sex (1/sex/cuib)            |
| Funcția motorie și senzorială                                | 20/sex (1/sex/cuib)            |
| Învățare și memorie  | 10/sex <sup>(a)</sup> (1/cuib) |

<sup>(a)</sup> În funcție de sensibilitatea testelor funcției cognitive, se ia în considerare investigarea unui număr mai mare de animale, de exemplu, până la 1 mascul și 1 femelă per cuib (pentru repartizarea animalelor, a se vedea anexa 1) [în Documentul de orientare OCDE nr. 43 se oferă orientări suplimentare privind dimensiunea eșantionului (8)].

## ▼ M5

**Dozare**

16. Se utilizează cel puțin trei doze și un martor paralel. Nivelurile dozei sunt distanțate pentru a produce o gradare a efectelor toxice. Cu excepția cazului în care doza este limitată de natura fizico-chimică și biologică a substanței chimice, se alege cea mai ridicată doză cu scopul de a induce o oarecare toxicitate maternă [de exemplu, semne clinice, încetinirea creșterii în greutate (nu mai mult de 10 %) și/sau dovezi de toxicitate de limitare a dozei într-un organ țintă]. Doza ridicată poate fi limitată la 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu unele excepții. De exemplu, expunerea umană așteptată ar putea indica necesitatea utilizării unei doze mai ridicate. Alternativ, se efectuează studii pilot sau studii preliminare de stabilire a dozei pentru a determina cea mai ridicată doză de utilizat, care să producă un grad minim de toxicitate maternă. Dacă substanța de testat s-a dovedit a fi toxică pentru dezvoltare, fie într-un studiu standard de toxicitate asupra dezvoltării, fie într-un studiu pilot, cea mai ridicată doză ar trebui să fie doza maximă care nu va induce toxicitate excesivă la urmași sau deces intrauterin sau neonatal sau malformații, suficientă pentru a exclude o evaluare semnificativă a neurotoxicității. Doza cea mai mică nu trebuie să producă niciun efect toxic asupra mamei sau asupra dezvoltării, inclusiv neurotoxicitate. Se selectează o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra o eventuală relație doză-efect și nivelul dozei fără efecte adverse vizibile (NOAEL) sau doze aproape de limita de detecție care ar permite stabilirea unei doze de referință. În mod frecvent, pentru stabilirea seriei descrescătoare a dozelor, intervalul optim este un factor de 2 sau 4 și deseori este preferabil să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.
  
17. Pentru selectarea nivelurilor dozelor se ține seama de toate datele existente privind toxicitatea, precum și de informațiile suplimentare privind metabolismul și toxicocinetica substanței de testat sau a materialelor cu o structură analogă. Informațiile respective se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra caracterul adecvat al regimului de dozare. Ar trebui să se ia în considerare dozarea directă a puilor pe baza expunerii și a informațiilor farmacocinetice (28) (29). Înainte de a efectua studii de dozare directă, se realizează o examinare atentă a avantajelor și a dezavantajelor (30).
  
18. Grupul martor paralel este un grup martor supus unui tratament simulat sau unui tratament exclusiv cu vehicul, în cazul în care pentru administrarea substanței chimice testate se utilizează un vehicul. În mod normal, tuturor animalelor li se administrează același volum de substanță testată sau de vehicul în funcție de greutatea corporală. Dacă se folosește un vehicul sau un alt aditiv pentru a facilita administrarea dozei, se iau în considerare următoarele caracteristici: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței chimice testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice, precum și efectele asupra consumului de hrană sau apă ori asupra stării de nutriție a animalelor. Vehiculul nu ar trebui să producă efecte care ar putea să interfereze cu interpretarea studiului și trebuie să nu fie toxic din punct de vedere neurocomportamental și să nu aibă efecte asupra reproducerii sau dezvoltării. Pentru substanțele noi utilizate ca vehicul, trebuie să se includă un grup martor supus unui tratament simulat în plus față de un grup martor pentru vehicul. Animalele din grupul/grupurile martor se manipulează la fel cu animalele din grupul tratat.

## ▼ M5

**Administrarea dozelor**

19. Substanța chimică testată sau vehiculul se administrează pe calea cea mai relevantă pentru expunerea umană potențială și pe baza informațiilor privind metabolizarea și circulația la animalele de experiență. Calea de administrare va fi, în general, orală (de exemplu, gavaj, prin alimentație, în apa de băut), dar pot fi utilizate și alte căi (de exemplu, inhalare) în funcție de caracteristicile și de căile de expunere cunoscute sau anticipate la om [precizări suplimentare sunt furnizate în documentul de orientare nr. 43 (8)]. Trebuie să se ofere o justificare pentru calea de administrare aleasă. Substanța chimică testată se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi.
20. Doza administrată fiecărui animal se calculează în mod normal în funcție de greutatea corporală individuală la cea mai recentă cântărire. Cu toate acestea, în ultimul trimestru al gestației, doza se calculează cu prudență. Dacă se observă o toxicitate excesivă la mame, animalele în cauză sunt eutanasiate.
21. Substanța chimică testată sau vehiculul se administrează, ca un minim, zilnic la femelele care s-au împerecheat din momentul implantării (ziua 6 de gestație) pe parcursul alăptării (PND 21), astfel încât puii să fie expuși la substanța testată în timpul dezvoltării neurologice prenatale și postnatale. Vârsta la care începe tratamentul, precum și durata și frecvența administrării pot fi adaptate în cazul în care dovezile sprijină un concept experimental mai relevant pentru expunerile umane. Duratele de dozare se adaptează pentru alte specii cu scopul de a asigura expunerea în timpul tuturor stadiilor timpurii de dezvoltare a creierului (și anume, echivalentul dezvoltării prenatale și postnatale timpurii a creierului uman). Tratamentul poate începe de la inițierea gestației (ziua 0 de gestație), deși ar trebui să se țină seama de eventualitatea ca substanța chimică de testat să provoace pierdere în faza de preimplantare. Administrarea care pornește din ziua 6 de gestație ar evita acest risc, dar nu ar fi tratate etapele de dezvoltare între ziua 0 și ziua 6 de gestație. Atunci când un laborator achiziționează animale împerecheate anterior, nu este posibil să se înceapă administrarea dozelor în ziua 0 de gestație, prin urmare, ziua 6 de gestație ar fi o zi adecvată de pornire. Laboratorul de testare stabilește regimul de dozare în funcție de informațiile relevante cu privire la efectele substanței chimice de testat, experiența prealabilă și considerentele logistice; acesta poate include prelungirea administrării dincolo de înțărare. Tratamentul nu se va administra la data fătării în cazul animalelor care nu au încheiat fătarea puilor. În general, se presupune că expunerea puilor va avea loc prin laptele matern; cu toate acestea, în cazurile în care există o lipsă a dovezilor de expunere continuă la pui, trebuie să se ia în considerare dozarea directă a puilor. Dovezile de expunere continuă pot fi obținute, de exemplu, din informațiile farmacocinetice, toxicitatea la nivelul puilor sau modificările la nivelul biomarkerilor (28).

**OBSERVAȚII****Observații privind femelele**

22. Toate femelele se observă cu atenție cel puțin o dată pe zi în ceea ce privește starea de sănătate a acestora, inclusiv pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.
23. În timpul perioadelor de tratament și de observație, se efectuează în mod periodic observații clinice mai detaliate (cel puțin de două ori pe parcursul perioadei de administrare în timpul gestației și de două ori în timpul perioadei de administrare în timpul alăptării) utilizând cel puțin zece femele pentru fiecare nivel de doză. Animalele se observă în afara cuștii de către tehnicieni calificați care nu sunt informați cu privire la tratamentul administrat animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a reduce stresul animalelor, pentru a asigura un nivel maxim de imparțialitate din partea observatorului și pentru a maximiza fiabilitatea datelor provenite de la observatori diferiți. În cazul în care este posibil, se recomandă ca observațiile dintr-un anumit studiu să fie făcute de același tehnician.



**▼ M5**

24. Prezența semnelor observate se consemnează. Ori de câte ori este posibil, se consemnează, de asemenea, magnitudinea semnelor observate. Observațiile clinice vizează, dar nu se limitează la, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimare, erecție piloasă, dimensiunea pupilei, respirație anormală și/sau respirație pe gură și orice semne neobișnuite de urinare sau defecație).
25. Se consemnează, de asemenea, toate reacțiile neobișnuite legate de poziția corpului, nivelul de activitate (de exemplu, explorarea mai intensă sau mai redusă a zonei standard) și coordonarea mișcărilor. Se înregistrează, de asemenea, modificările mersului (de exemplu, mers legănat, ataxie), modificările posturii corpului (de exemplu, cocoșe) și reacțiile la manipulare, la locul în care se află și la alți stimuli din mediu, precum și prezența unor mișcări clonice sau tonice, a convulsiilor sau a tremorului, comportamente stereotipe (de exemplu, curățarea excesivă, mișcări neobișnuite ale capului, mișcări circulare repetate), precum și comportamentele bizare (de exemplu, mușcăături sau lins excesiv, automutilare, mers înapoi, emiterea de sunete) sau agresivitatea.
26. Se notează semnele de toxicitate, inclusiv data apariției, momentul zilei, gradul și durata.
27. Animalele se cântăresc la momentul administrării cel puțin săptămânal pe parcursul studiului, la data sau aproape de data administrării, precum și la PND 21 (înțarcare). Pentru studiile efectuate prin gavaj, femelele trebuie cântărite cel puțin de două ori pe săptămână. Dozele se ajustează în mod corespunzător la momentul fiecărei determinări a greutatei corporale. Consumul de hrană se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în timpul gestației și alăptării. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în cazul în care expunerea se face prin intermediul apei.

**Observații asupra puilor**

28. Toți puii sunt observați cu atenție cel puțin zilnic pentru a consemna simptomele de toxicitate și pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.
29. În timpul perioadelor de tratament și de observație, se efectuează observații clinice mai detaliate a puilor. Puii (cel puțin un pui/sex/cuib) sunt observați de către tehnicieni calificați care nu sunt informați cu privire la tratamentul administrat animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a asigura un nivel maxim de imparțialitate și pentru a maximiza fiabilitatea datelor obținute de observatori diferiți. În cazul în care este posibil, se recomandă ca observațiile dintr-un anumit studiu să fie făcute de același tehnician. Trebuie să se monitorizeze cel puțin caracteristicile descrise la punctele 24 și 25, după cum este adecvat pentru etapa de dezvoltare observată.
30. Se notează toate simptomele de toxicitate la pui, inclusiv data apariției, momentul zilei, gradul și durata.

**Repere fizice și de dezvoltare**

31. Modificările la nivelul reperelor de dezvoltare înainte de înțarcare (de exemplu, desfășurarea pavilionului urechii, deschiderea ochilor, erupția incisivilor) sunt corelate în mare măsură cu greutatea corporală (30) (31). Greutatea corporală poate fi cel mai bun indicator de dezvoltare fizică. Prin urmare, se recomandă măsurarea reperelor de dezvoltare doar în cazul în care există dovezi prealabile care atestă că respectivele criterii de evaluare vor furniza informații suplimentare. Calendarul pentru evaluarea parametrilor este indicat în tabelul 1. În funcție de efectele anticipate, precum și de rezultatele măsurărilor inițiale, ar putea fi recomandabil să se adauge intervale de timp suplimentare sau să se efectueze măsurătorile în alte etape de dezvoltare.

## ▼ M5

32. Atunci când se evaluează dezvoltarea fizică, este recomandabil să se utilizeze vârsta postcoitală, în loc de vârsta postnatală (33). Dacă puii sunt testați în ziua de înțarcare, se recomandă ca testarea să fie efectuată înainte de înțarcarea efectivă pentru a evita un efect de confuzie provocat de stresul asociat înțarcării. În plus, trebuie să se asigure că orice testare a puilor după înțarcare nu are loc în cele două zile după înțarcare.

Tabelul 1

**Calendarul evaluării reperelor fizice și de dezvoltare, precum și a criteriilor de evaluare funcțională/comportamentală <sup>(a)</sup>**

| Perioade de vârstă<br>Criterii de evaluare | Înainte de înțarcare <sup>(b)</sup> | Adolescență <sup>(b)</sup> | Adulți tineri <sup>(b)</sup> |
|--|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|--|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|

**Repere fizice și de dezvoltare**

| Greutatea corporală și observații clinice | Săptămânal <sup>(c)</sup> | cel puțin o dată la două săptămâni | cel puțin o dată la două săptămâni |
|---|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Greutatea creierului                      | PND 22 <sup>(d)</sup>     |                                    | la sacrificare                     |
| Neuropatologia                            | PND 22 <sup>(d)</sup>     |                                    | la sacrificare                     |
| Maturizarea sexuală                       | —                         | după caz                           | —                                  |
| Alte repere de dezvoltare <sup>(e)</sup>  | după caz                  | —                                  | —                                  |

**Criteriile de evaluare funcțională/comportamentală**

|   |                           |                |                |
|---|---------------------------|----------------|----------------|
| Ontogeneza comportamentului                 | Cel puțin două măsurători |                |                |
| Activitatea motorie (inclusiv de acomodare) | 1-3 ori <sup>(f)</sup>    | —              | o singură dată |
| Funcțiile motorie și senzorială             | —                         | o singură dată | o singură dată |
| Învățare și memorie                         | —                         | o singură dată | o singură dată |

<sup>(a)</sup> Tabelul prezintă numărul minim de repetări ale măsurătorilor. În funcție de efectele anticipate, precum și de rezultatele măsurătorilor inițiale, ar putea fi recomandabil să se adauge intervale de timp suplimentare (de exemplu, animalele în vârstă) sau să se efectueze măsurătorile în alte stadii de dezvoltare.

<sup>(b)</sup> Se recomandă ca puii să nu fie testați în cele două zile după înțarcare (a se vedea punctul 32). Vârstele recomandate pentru testarea adolescenților sunt: învățare și memorie = PND 25 ± 2; funcțiile motorie și senzorială = PND 25 ± 2. Vârstele recomandate pentru testarea adulților tineri sunt PND 60-70.

<sup>(c)</sup> Greutățile corporale se măsoară cel puțin de două ori pe săptămână în cazul administrării directe a tratamentului pentru adaptarea dozelor într-un moment de creștere rapidă în greutate a corpului.

<sup>(d)</sup> Greutățile creierului și neuropatologia pot fi evaluate mai devreme (de exemplu, PND 11), dacă este cazul (a se vedea punctul 39).

<sup>(e)</sup> Atunci când este cazul, se notează și alte repere de dezvoltare pe lângă greutatea corporală (de exemplu, deschiderea ochilor) (a se vedea punctul 31).

<sup>(f)</sup> A se vedea punctul 35.

33. Se numără și se stabilește sexul puilor vii, de exemplu, prin inspecție vizuală sau prin măsurarea distanței ano-genitale (34) (35), iar fiecare pui dintr-un cuib se cântărește individual, la fătare sau imediat după aceea, cel puțin săptămânal pe parcursul alăptării și, ulterior, cel puțin o dată la fiecare două săptămâni. Atunci când se evaluează maturitatea sexuală, se determină vârsta și greutatea corporală a animalului la momentul în care are loc permeabilitatea vaginală (36) și separarea prepuțială (37) cel puțin la un mascul și o femelă per cuib.

▼ **M5****Ontogeneza comportamentului**

34. Ontogeneza anumitor comportamente se măsoară la cel puțin un pui/sex/cuib pe parcursul perioadei de vârstă corespunzătoare, aceiași pui fiind utilizați în toate zilele de testare pentru toate comportamentele evaluate. Zilele de măsurare trebuie să fie distanțate pe parcursul perioadei, pentru a defini modificarea, normală sau corelată cu tratamentul, a ontogenezei comportamentului respectiv (38). Următoarele sunt câteva exemple de comportamente a căror ontogeneză ar putea fi evaluată: reflexul de redresare, geotaxia negativă și activitatea motorie (38) (39) (40).

**Activitatea motorie**

35. Activitatea motorie se monitorizează (41) (42) (43) (44) (45) în cursul perioadelor dinainte de înțărare și la vârsta adultă. Pentru testare la momentul înțărării, a se vedea punctul 32. Sesiunea de testare trebuie să fie suficient de lungă pentru a demonstra acomodarea intrasesiune pentru grupul martor netratat. Se recomandă utilizarea activității motorii pentru a evalua ontogeneza comportamentului. În cazul în care se utilizează ca test al ontogenezei comportamentului, atunci testarea trebuie să utilizeze aceleași animale, pentru toate sesiunile de testare înainte de înțărare. Testarea trebuie să fie suficient de frecventă pentru a evalua ontogeneza acomodării intrasesiune (44). Acest lucru poate necesita trei sau mai multe perioade de timp înainte de și, inclusiv, în ziua de înțărare (de exemplu, PND 13, 17, 21). Testarea acelorași animale sau pui din același cuib trebuie să aibă loc, de asemenea, la o vârstă adultă aproape de sacrificare (de exemplu, PND 60-70). După caz, se poate efectua testare în zile suplimentare. Activitatea motorie se monitorizează prin intermediul unui dispozitiv automat de înregistrare a activității care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității (de exemplu, activitatea bazală măsurată de dispozitiv nu trebuie să fie atât de scăzută, încât să împiedice detectarea reducerii, nici atât de mare, încât să împiedice detectarea intensificării activității). Fiecare dispozitiv trebuie să fie testat prin metode standard pentru a se asigura, în măsura în care este posibil, fiabilitatea funcționării tuturor dispozitivelor și în toate zilele. În măsura în care este posibil, grupurile de tratament se distribuie în mod echilibrat pe toate dispozitivele. Fiecare animal trebuie să fie testat în mod individual. Grupurile de tratament trebuie să fie compensate în toate intervalele de testare pentru a evita interpretări eronate provocate de ritmul circadian de activitate. Ar trebui depuse eforturi pentru a garanta că variațiile condițiilor de testare sunt minime și că acestea nu sunt legate în mod sistematic de tratament. Printre variabilele care pot afecta numeroase măsurători ale comportamentului, inclusiv activitatea motorie, se numără nivelul de zgomot, dimensiunea și forma cuștii experimentale, temperatura, umiditatea relativă, condițiile de lumină, mirosurile, utilizarea cuștii sau a unei noi cuști experimentale și distragerile de mediu.

**Funcțiile motorie și senzorială**

36. Funcțiile motorie și senzorială se examinează în detaliu cel puțin o dată în perioada de adolescent și o dată în perioada de adult tânăr (de exemplu, PND 60-70). Pentru testarea la momentul înțărării, a se vedea punctul 32. Trebuie să se realizeze o testare suficientă pentru a asigura o eșantionare cantitativă adecvată de modalități senzoriale (de exemplu, somato-senzoriale, vestibulare) și funcții motorii (de exemplu, forță, coordonare). Câteva exemple de teste ale funcțiilor motorii și senzoriale sunt răspunsul de împingere al extensorului (46), reflexul de redresare (47) (48), acomodarea reacției auditive (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54) și potențialele evocate (55).

▼ **M5****Teste de învățare și de memorie**

37. Testul de învățare și de memorie asociativă trebuie să se desfășoare după înțărare (de exemplu,  $25 \pm 2$  zile) și pentru adulții tineri (PND 60 și mai mult). Pentru testarea la momentul înțărării, a se vedea punctul 32. Pot fi utilizate același test sau teste separate în cele două etape de dezvoltare. Este permisă o anumită flexibilitate în selectarea testului (testelor) de învățare și de memorie în cazul șobolanilor înțărcați și adulți. Cu toate acestea, testul (testele) ar trebui să fie conceput(e) astfel încât să îndeplinească două criterii. În primul rând, învățarea se evaluează fie ca o modificare observată în timpul mai multor studii sau sesiuni repetate de învățare, fie prin intermediul unor teste care implică un singur studiu, cu referire la o condiție care verifică existența unor efecte neasociative ale experienței de învățare. În al doilea rând, testul (testele) trebuie să includă unele măsurători ale memoriei (pe termen scurt sau pe termen lung) în plus față de învățarea inițială (achiziție), dar măsurarea memoriei nu poate fi raportată în absența unei măsurări a achiziției obținute prin intermediul aceluiași test. În cazul în care testul (testele) de învățare și de memorie arată un efect al substanței de testat, se pot lua în considerare teste suplimentare pentru a se exclude interpretările alternative bazate pe modificări ale capacităților senzoriale, motivaționale și/sau motorii. În plus față de cele două criterii de mai sus, se recomandă ca testul de învățare și de memorie să fie selectat pe baza sensibilității dovedite la clasa substanței chimice care face obiectul investigației, în cazul în care astfel de informații sunt disponibile în literatura de specialitate. În absența unor astfel de informații, exemplele de teste care pot fi efectuate pentru a îndeplini criteriile de mai sus includ: evitarea pasivă (43) (56) (57), potrivire-întârziată-la-poziție în cazul șobolanului adult (58) și în cazul șobolanului copil (59), condiționarea olfactivă (43) (60), labirintul de apă Morris (61) (62) (63), labirintul Biel sau Cincinnati (64) (65), labirintul brațului radial (66), labirintul-T (43), precum și achiziția și fixarea comportamentului controlat de program (26) (67) (68). În literatura de specialitate sunt descrise teste suplimentare pentru șobolanii înțărcați (26) (27) și șobolanii adulți (19) (20).

**Examinarea post-mortem**

38. Mamele pot fi eutanasiate după înțărarea puilor.
39. Evaluarea neuropatologică a puilor se va efectua utilizând țesuturi de la animalele eutanasiate la PND 22 sau mai devreme, între PND 11 și PND 22, precum și la încheierea studiului. Pentru puii sacrificați până la PND 22, se evaluează țesuturile cerebrale; pentru animalele sacrificate la încheierea studiului, se evaluează atât țesuturile sistemului nervos central (SNC), cât și țesuturile sistemului nervos periferic (SNP). Animalele sacrificate la PND 22 sau mai devreme pot fi fixate prin imersiune sau perfuzare. Animalele sacrificate la încheierea studiului se fixează prin perfuzare. Toate aspectele legate de pregătirea probelor de țesut, de la perfuzarea animalelor la disecția probelor de țesuturi, prelucrarea țesuturilor și impregnarea lamelelor, utilizează un concept compensat, astfel că fiecare grup va conține eșantioane reprezentative din fiecare grup tratat. Orientări suplimentare privind neuropatologia pot fi consultate în documentul de orientare nr. 20 al OCDE (9), a se vedea, de asemenea, punctul 103.

**Prelucrarea probelor de țesut**

40. Se notează toate anomaliile macroscopice aparente la momentul autopsiei. Probele de țesut prelevate trebuie să reprezinte toate regiunile importante ale sistemului nervos. Probele de țesut prelevate se păstrează într-un fixator adecvat și se prelucrează în conformitate cu protocoalele histologice publicate standardizate (69) (70) (71) (103). Încorporarea în parafină este acceptabilă pentru țesuturi ale SNC și SNP, dar utilizarea osmiului în procedura de postfixare, împreună cu încorporarea epoxi, ar putea fi

## ▼ M5

adekvată atunci când este necesar un grad mai mare de rezoluție (de exemplu, pentru nervii periferici, atunci când se suspectează o neuropatie periferică și/sau pentru analiza morfometrică a nervilor periferici). Țesutul cerebral colectat pentru analiza morfometrică se încorporează în medii adecvate la toate nivelurile dozei în același timp pentru a evita contracția artefactelor care poate fi asociată cu depozitarea prelungită în fixator (6).

### Examinarea neuropatologică

41. Obiectivele examinării calitative sunt:

- (i) identificarea regiunilor din sistemul nervos care prezintă semne de modificări neuropatologice;
- (ii) identificarea tipurilor de modificări neuropatologice rezultate din expunerea la substanța de testat; și
- (iii) determinarea intervalului de severitate a modificărilor neuropatologice.

Secțiunile histologice reprezentative din eșantioanele de țesut se examinează la microscop de către un patolog instruit în mod corespunzător pentru a constata modificările neuropatologice. Pentru toate modificările neuropatologice se atribuie o notă subiectivă care indică severitatea. O colorație cu hematoxilină-eozină poate fi suficientă pentru evaluarea secțiunilor de creier de la animalele eutanasiate la PND 22 sau mai devreme. Cu toate acestea, pentru secțiunile de țesut de la nivelul SNC și SNP prelevate de la animalele sacrificate la încheierea studiului se recomandă o colorație cu mielină (de exemplu, luxol fast blue/violet de crezil) și colorație cu argint (de exemplu, colorațiile Bodian sau Bielschowsky). În funcție de aprecierea profesională a patologului și de tipul modificărilor observate, pot fi considerate adecvate alte metode de colorație pentru a identifica și a caracteriza anumite tipuri de modificări [de exemplu, proteină acidă fibrilară glială (GFAP) sau teste histochimice ale lectinei pentru a evalua modificările gliale și microgliale (72), fluoro-jad pentru a detecta necroza (73) (74) sau metode de impregnare cu argint specifice pentru degenerarea neuronală (75)].

42. Se efectuează evaluarea morfometrică (cantitativă), întrucât datele pot contribui la detectarea unor efecte corelate cu tratamentul și sunt importante pentru interpretarea diferențelor corelate cu tratamentul constatate în ceea ce privește greutatea sau morfologia creierului (76) (77). Țesuturile nervoase se eșantionează și se pregătesc pentru a permite evaluarea morfometrică. Evaluările morfometrice pot include, de exemplu, măsurători liniare sau zonale ale unor regiuni specifice ale creierului (78). Măsurătorile liniare sau zonale implică utilizarea de secțiuni omoloage atent selecționate pe baza unor repere microscopice fiabile (6). Stereologia poate fi utilizată pentru a identifica efecte corelate cu tratamentul asupra unor parametri cum ar fi volumul sau numărul de celule pentru anumite regiuni neuroanatomice (79) (80) (81) (82) (83) (84).
43. Se examinează creierul pentru a constata orice semne de modificări neuropatologice corelate cu tratamentul și, pentru a asigura o examinare aprofundată, se prelevează eșantioane adecvate din toate regiunile majore ale creierului (de exemplu, bulbii olfactivi, cortexul cerebral, hipocamp, ganglionii bazali, talamus, hipotalamus, mezencefal [*tectum*, *tegmentum* și *pedunculii cerebrali*], punte (lat. *pons*), bulb rahidian (lat. *medulla oblongata*), cerebel]. Este important ca la toate animalele secțiunile să fie prelevate în același plan. La adulții eutanasiați la încheierea studiului, se prelevează secțiuni reprezentative din măduva spinării și SNP. Zonele examinate trebuie să includă ochiul cu nervul optic și retina, măduva spinării la nodurile cervical și lombar, fibrele rădăcinii dorsale și ventrale, nervul sciatic proximal, nervul tibial proximal (la nivelul genunchiului) și ramurile nervului tibial al mușchiului gambei. Secțiunile din măduva spinării și din nervii periferici trebuie să includă secțiuni atât transversale, cât și longitudinale.

## ▼M5

44. Evaluarea neuropatologică trebuie să includă o examinare care vizează indicii de leziuni legate de dezvoltare la nivelul sistemului nervos (6) (85) (86) (87) (88) (89), în plus față de modificările celulare (de exemplu, vacuolizare neuronală, degenerare, necroză) și modificările tisulare (de exemplu, glioza, infiltrarea cu leucocite, formarea de chisturi). În acest sens, este important să se distingă între efectele corelate cu tratamentul și evenimentele de dezvoltare normală care au loc într-o etapă de dezvoltare care corespunde momentului eutanasierii (90). Exemple de modificări semnificative care indică defecte de dezvoltare includ, dar nu se limitează la:

- modificări ale dimensiunii sau ale formei macroscopice a bulbilor olfactivi, a creierului mare sau a cerebelului;
- modificări ale dimensiunii relative a diferitelor regiuni ale creierului, inclusiv scăderi sau creșteri ale dimensiunii regiunilor care rezultă din pierderea sau persistența unor populații de celule sau proiecții axonale care sunt în mod normal tranzitorii (de exemplu, stratul germinal extern al cerebelului, corpul calos);
- modificări la nivelul proliferării, al migrației și al diferențierii, astfel cum sunt acestea indicate de zone de apoptoză sau necroză excesivă, aglomerații sau populații dispersate de neuroni ectopici, dezorientați sau malformați sau modificări ale dimensiunii relative a diferitelor straturi de structuri corticale;
- modificări ale structurii de mielinizare, inclusiv o reducere generală a dimensiunii sau o colorație modificată a structurilor mielinizate;
- dovezi de hidrocefalie, în special extinderea ventriculelor, stenoza apeductului cerebral și subțierea emisferelor cerebrale.

#### Analiza relației doză-răspuns a modificărilor neurologice

45. Pentru analizele calitative și cantitative neuropatologice se recomandă următoarea procedură din punct de vedere al etapelor. În primul rând, secțiunile prelevate de la grupul tratat cu doza maximă sunt comparate cu cele ale grupului martor. În cazul în care nu se constată semne de modificări neurologice la animalele din grupul tratat cu doza maximă, nu este necesară o analiză suplimentară. În cazul în care se constată dovezi ale alterărilor neurologice la grupul tratat cu doza maximă, se examinează animalele din grupurile tratate cu dozele intermediare și, respectiv, doza cea mai scăzută. În cazul în care grupul tratat cu doza maximă este eliminat din cauza decesului sau a altor factorii asociați cu toxicitatea, se analizează modificările neurologice corespunzătoare dozei maxime și medii. În cazul în care există vreun indiciu de neurotoxicitate în grupurile tratate cu doze mai scăzute, se efectuează analiza neuropatologică a grupurilor respective. Dacă în examinările calitative sau cantitative se constată vreo modificare neurologică asociată tratamentului, se stabilește dependența de doză a incidenței, a frecvenței și a gradului de severitate a leziunilor sau a modificărilor morfometrice pe baza unei evaluări a tuturor animalelor din toate grupurile tratate. În evaluare trebuie să fie incluse toate regiunile creierului care prezintă vreo dovadă de modificare neuropatologică. Pentru fiecare tip de leziune, sunt descrise caracteristicile utilizate pentru definirea fiecărui grad de severitate, indicând caracteristicile utilizate pentru diferențierea fiecărui grad. Se notează frecvența fiecărui tip de leziune și nivelul de severitate a acestora și se efectuează o analiză statistică pentru a evalua caracterul unei relații doză-răspuns. Se recomandă utilizarea unor lamele codificate (91).

#### DATE ȘI RAPORTARE

##### Data

46. Datele se raportează în mod individual și se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare grup de experiență, tipurile de schimbări și numărul de femele, puii în funcție de sex și cuiburile care prezintă fiecare tip de modificare. În cazul în care s-a efectuat expunerea postnatală directă a puilor, se raportează calea, durata și perioada de expunere.

▼ **M5****Evaluarea și interpretarea rezultatelor**

47. Un studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare va oferi informații cu privire la efectele expunerii repetate la o substanță chimică în timpul dezvoltării intrauterine și postnatale timpurii. Întrucât accentul este plasat atât pe efectele de toxicitate generală, cât și pe efectele de neurotoxicitate pentru dezvoltare, rezultatele studiului vor permite distingerea între efectele de neurodezvoltare care se produc în absența toxicității materne generale și cele care se manifestă doar la niveluri care sunt toxice, de asemenea, pentru femela gestantă. Din cauza relațiilor complexe de interdependență între conceptul studiului, analiza statistică și semnificația biologică a datelor, interpretarea adecvată a datelor privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare va implica expertiză (107) (109). Interpretarea rezultatelor testelor ar trebui să utilizeze o abordare bazată pe forța probantă a dovezilor (20) (92) (93) (94). Se discută modelele de comportament sau constatările morfologice, în cazul în care acestea sunt prezente, precum și dovezile vizând relația doză-efect. În caracterizare sunt incluse datele de la toate studiile relevante pentru evaluarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv studii epidemiologice umane sau rapoarte de caz și studii experimentale pe animale (de exemplu, date toxicocinetice, informații privind relația structură-activitate, date de la alte studii de toxicitate). Aceasta include relația dintre dozele de substanță de testat și prezența sau absența, incidența și amploarea oricăror efecte neurotoxice pentru fiecare sex (20) (95).
48. Evaluarea datelor trebuie să includă o analiză atât a semnificației biologice, cât și a celei statistice. Analiza statistică este considerată un instrument de orientare, mai degrabă decât de stabilire a interpretării datelor. Lipsa de semnificație statistică nu trebuie să fie singurul motiv pentru a conchide lipsa unui efect asociat tratamentului, la fel cum semnificația statistică nu trebuie să fie singura justificare pentru a constata prezența unui efect asociat tratamentului. Pentru a preîntâmpina eventuale constatări fals-negative și dificultățile inerente în a „dovedi un negativ”, se analizează datele pozitive disponibile și datele martor istorice, în special atunci când nu se observă efecte corelate cu tratamentul (102) (106). Se analizează probabilitatea unor rezultate fals-pozitive luând în considerare evaluarea statistică integrală a datelor (96). Evaluarea va include relația, dacă există, între modificările neuropatologice și comportamentale observate.
49. Toate rezultatele sunt analizate cu ajutorul unor modele statistice adecvate conceptului experimental (108). Alegerea unei analize parametrice sau neparametrice se justifică prin luarea în considerare a unor factori cum ar fi natura datelor (transformate sau nu) și distribuția acestora, precum și soliditatea relativă a analizei statistice selectate. Scopul și conceptul studiului ar trebui să ghideze alegerea analizelor statistice pentru a reduce la minimum erori de rezultate de tip I (fals pozitive) și de tip II (fals negative) (96) (97) (104) (105). Studiile de dezvoltare care utilizează specii multipare în cadrul cărora sunt testați mai mulți pui per cuib ar trebui să includă cuibul în modelul statistic pentru a evita creșterea ratelor de eroare de tip I (98) (99) (100) (101). Unitatea statistică de măsurare ar trebui să fie cuibul, și nu puiul. Experimentele trebuie concepute astfel încât ceilalți pui din cuib să nu fie tratați ca observații independente. Orice parametru măsurat în mod repetat pe același subiect trebuie analizat cu ajutorul unor modele statistice care determină lipsa caracterului independent al măsurătorilor.

**Raport de testare**

50. Raportul de testare va conține următoarele informații:

*Produsul chimic de testat:*

— natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare, inclusiv sursa;



**▼ M5**

- puritatea preparatului și impuritățile cunoscute și/sau anticipate.

*Vehicul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului, dacă acesta este altul decât apa sau serul fiziologic.

*Animale de testare:*

- speciile și sușa utilizată și o justificare dacă specia este alta decât șobolanul;
- furnizorul animalelor de testare;
- numărul, vârsta la începutul studiului și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar, apa etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului.

*Condiții de testare:*

- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- justificarea căii de administrare și a perioadei de timp;
- specificații privind dozele administrate, inclusiv detalii cu privire la vehiculul, volumul și starea de agregare a substanței administrate;
- detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;
- metoda utilizată pentru identificarea unică a femelelor și a puilor;
- o descriere detaliată a procedurii/procedurilor de randomizare utilizată/ utilizate pentru a repartiza femelele în grupurile de tratament, pentru a selecta puii pentru sacrificare și pentru a repartiza puii în grupurile testate;
- detalii cu privire la administrarea substanței de testat;
- conversia de la administrarea prin hrană/apă potabilă sau prin inhalare a concentrației substanței chimice de testare (ppm) în doză efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- condițiile de mediu;
- detalii cu privire la calitatea hranei și a apei (de exemplu, apă de la robinet, apă distilată);
- datele de început și de încheiere a studiului.

*Observații și proceduri de testare:*

- o descriere detaliată a procedurilor utilizate pentru a standardiza observațiile și procedurile, precum și definițiile operaționale pentru punctarea observațiilor;
- o listă cu toate metodele de testare utilizate și justificarea utilizării acestora;
- detalii privind procedurile comportamentale/funcționale, patologice, neurochimice sau electrofiziologice utilizate, inclusiv informații și detalii privind dispozitivele automatizate;
- procedurile de calibrare și de garantare a echivalenței dispozitivelor și echilibrarea grupurilor de tratament în procedurile de testare;
- o scurtă justificare care să explice orice decizii care implică un raționament profesional.



**▼M5**

*Rezultate (individuale și rezumatul acestora, inclusiv media și varianța, atunci când este cazul):*

- numărul de animale la începutul studiului și numărul acestora la încheierea studiului;
- numărul de animale și de cuiburi utilizate pentru fiecare metodă de testare;
- numărul de identificare al fiecărui animal, precum și cuibul din care provine;
- mărimea cuibului și greutatea medie la fătare pe sexe;
- date privind greutatea corporală și modificarea greutății corporale, inclusiv greutatea corporală la deces pentru femele și pui;
- date privind consumul de alimente, precum și date privind consumul de apă, dacă este cazul (de exemplu, în cazul în care substanța chimică testată este administrată prin intermediul apei);
- date privind reacția toxică, în funcție de sex și de nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate sau mortalitate, inclusiv ora și cauza decesului, dacă este cazul;
- natura, gravitatea, durata, data apariției, momentul din zi și evoluția observațiilor clinice detaliate;
- punctajul obținut pentru fiecare reper de dezvoltare (greutatea, maturizarea sexuală și ontogeneza comportamentului) la fiecare observare;
- o descriere detaliată a tuturor constatărilor comportamentale, funcționale, neuropatologice, neurochimice, electrofiziologice în funcție de sex, inclusiv creșteri și scăderi în raport cu grupurile martor;
- rezultatele autopsiei;
- greutatea creierului;
- orice diagnostice derivate din simptome și leziuni neurologice, inclusiv boli sau afecțiuni care apar în mod natural;
- imagini ale constatărilor exemplare;
- imagini cu putere redusă pentru a evalua omologia secțiunilor utilizate pentru morfometrie;
- date privind absorbția și metabolismul, inclusiv date suplimentare de la un studiu toxicocinetic separat, dacă sunt disponibile;
- tratarea statistică a rezultatelor, inclusiv modelele statistice utilizate pentru analizarea rezultatelor și rezultatele, indiferent dacă acestea au fost sau nu semnificative;
- lista personalului implicat în studiu, inclusiv formarea profesională.

*Discutarea rezultatelor:*

- informații privind relația doză-răspuns, în funcție de sex și de grup;
- legătura dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței chimice testate, în funcție de sex și de grup;
- impactul oricărei informații toxicocinetice asupra concluziilor;
- asemănările cu efectele oricăror substanțe neurotoxice cunoscute;

▼ **M5**

- datele care susțin fiabilitatea și sensibilitatea metodei de testare (de exemplu, date pozitive și date martor istorice);
- relații, în cazul în care există, între efectele neuropatologice și funcționale;
- NOAEL sau doza de referință pentru femele și pui, în funcție de sex și de grup.

*Concluzii:*

- o discuție privind interpretarea generală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică de testat a cauzat sau nu neurotoxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponibil la: [[http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS\\_Harmonized/870\\_Health\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Series/](http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/)].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponibil la: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Disponibil la: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Disponibil la: [[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html)].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

## ▼M5

- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1<sup>st</sup> Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- (14) Capitolul B.34 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra reproducerii la o generație.
- (15) Capitolul B.35 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra reproducerii pe durata a două generații.
- (16) Capitolul B.43 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate pe rozătoare.
- (17) Capitolul B.31 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra dezvoltării prenatale.
- (18) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals* (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Disponibil la: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Disponibil la: [<http://www.intox.org/data-bank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1<sup>st</sup> Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.

## ▼ M5

- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.
- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

## ▼M5

- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone, London.

## ▼ M5

- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.
- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Izarray, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.

## ▼M5

- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.
- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A „best practices” approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.



**▼ M5**

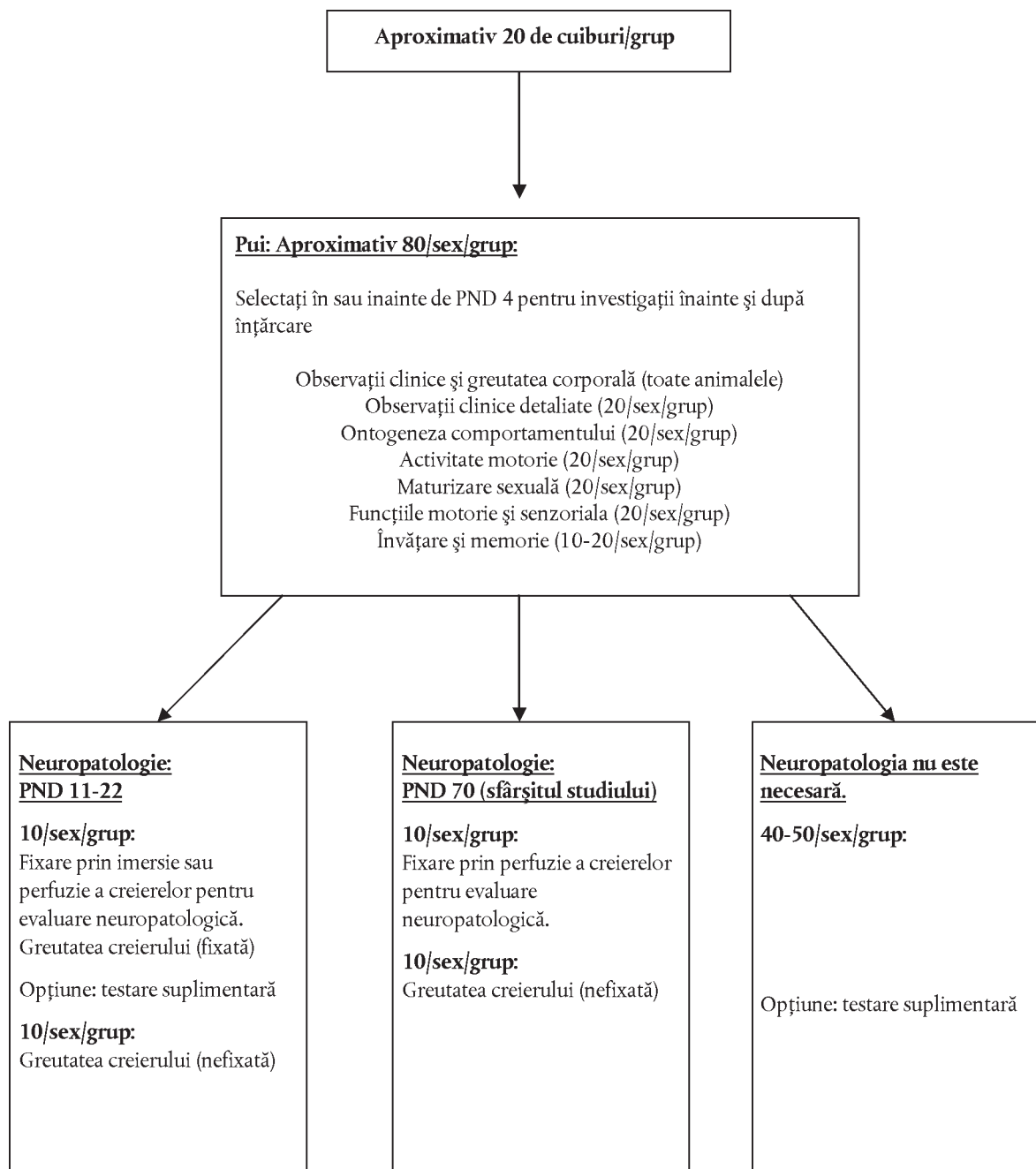
- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.



▼ M5

Figura 1

Program general de testare pentru teste funcționale/comportamentale, evaluarea neuropatologiei, precum și greutatea creierului. Diagrama se bazează pe descrierea de la punctele 13-15 (PND = ziua după fătare). Exemple de repartizare a animalelor sunt prezentate în apendicele 1.



▼ **M5***Apendicele 1*

- Exemple de posibile distribuiri sunt descrise și tabelate mai jos. Exemplele sunt furnizate pentru a ilustra faptul că distribuirea animalelor de studiu în diferite modele de testare poate fi realizată în mai multe moduri diferite.

**Exemplul 1**

- Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea înainte de înțarcare a ontogenezei comportamentului. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiate la PND 22. Creierile sunt îndepărtate, cântărite și prelucrate pentru evaluare histopatologică. De asemenea, sunt colectate date privind greutatea creierului utilizând creiere nefixate de la restul de 10 masculi și 10 femele pentru fiecare nivel de doză.
- Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru teste funcționale/comportamentale după înțarcare (observații clinice detaliate, activitate motorie, testarea reacției auditive și a funcției cognitive la adolescenți) și pentru evaluarea vârstei de maturizare sexuală. Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la încheierea studiului (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.
- Pentru testarea funcției cognitive la adulții tineri (de exemplu, PND 60-70), se utilizează un al treilea set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib). Dintre animalele respective, 10 animale/sex/grup (1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt sacrificate la încheierea studiului, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.
- Restul de 20 de animale/sex/grup sunt rezervate pentru eventuale teste suplimentare.

*Tabelul 1*

| Puiul nr. <sup>(a)</sup> |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test  |
|--------------------------|---|--------------------------------|---|
| m                        | f |                                |   |
| 1                        | 5 | 20 m + 20 f                    | Ontogeneza comportamentului   |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | PND 22 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului                    |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | PND 22 greutatea creierului   |
| 2                        | 6 | 20 m + 20 f                    | Observații clinice detaliate  |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Activitatea motorie   |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Maturizarea sexuală   |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Funcțiile motorie și senzorială   |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Învățarea și memoria (PND 25)   |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | Greutatea/neuropatologia/morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70 |

## ▼ M5

| Puiul nr. (a) |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test  |
|---------------|---|--------------------------------|---|
| m             | f |                                |   |
| 3             | 7 | 20 m + 20 f                    | Învățarea și memoria (adulți tineri)                      |
|               |   | 10 m + 10 f                    | Greutatea creierului la adultul tânăr ~ PND 70            |
| 4             | 8 | —                              | Animale de rezervă pentru înlocuiri și teste suplimentare |

(a) Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.

## Exemplul 2

6. Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea înainte de înțârcare a ontogenezei comportamentului. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiați la PND 11. Creierul este îndepărtat, cântărit și prelucrat pentru evaluare histopatologică.
7. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru examinări după înțârcare (observații clinice detaliate, activitate motorie, evaluarea vârstei de maturizare sexuală și a funcției motorii și senzoriale). Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la sacrificare (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.
8. Pentru testarea funcției cognitive la adolescenți și adulți tineri, se utilizează 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib). Pentru testarea funcției cognitive la PND 23 și la adulții tineri se utilizează animale diferite. La încheierea studiului, cele 10 animale/sex/grup testate ca adulți sunt sacrificate, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.
9. Restul de 20 de animale/sex/grup care nu au fost selectate pentru testare sunt sacrificate și eliminate la înțârcare.

Tabelul 2

| Puiul nr. (a) |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test  |
|---------------|---|--------------------------------|---|
| m             | f |                                |   |
| 1             | 5 | 20 m + 20 f                    | Ontogeneza comportamentului   |
|               |   | 10 m + 10 f                    | PND 11 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului                    |
| 2             | 6 | 20 m + 20 f                    | Observații clinice detaliate  |
|               |   | 20 m + 20 f                    | Activitatea motorie   |
|               |   | 20 m + 20 f                    | Maturizarea sexuală   |
|               |   | 20 m + 20 f                    | Funcțiile motorie și senzorială   |
|               |   | 10 m + 10 f                    | Greutatea/neuropatologia/morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70 |

## ▼ M5

| Puiul nr. <sup>(a)</sup> |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test  |
|--------------------------|---|--------------------------------|---|
| m                        | f |                                |   |
| 3                        | 7 | 10 m + 10 f <sup>(b)</sup>     | Învățarea și memoria (PND 23)   |
| 3                        | 7 | 10 m + 10 f <sup>(b)</sup>     | Învățarea și memoria (adulți tineri)<br>Greutatea creierului la adultul tânăr |
| 4                        | 8 | —                              | Animale sacrificate și eliminate PND 21                                       |

<sup>(a)</sup> Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.

<sup>(b)</sup> Pentru teste cognitive la PND 23 și la adulții tineri se utilizează pui diferiți (de exemplu, cuiburi pare/impare din totalul de 20).

## Exemplul 3

10. Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru cântărirea creierului și testarea neuropatologiei la PND 11. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiați la PND 11, iar creierele sunt îndepărtate, cântărite și prelucrate pentru evaluare histopatologică. De asemenea, sunt colectate date privind greutatea creierului utilizând creiere nefixate de la restul de 10 masculi și 10 femele pentru fiecare nivel de doză.
11. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea ontogenezei comportamentului (activitate motorie), examinări după înțarcare (activitate motorie și evaluarea vârstei de maturizare sexuală) și testarea funcției cognitive la adolescenți.
12. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru teste ale funcțiilor motorie și senzorială (testarea reacției auditive) și observații clinice detaliate. Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la încheierea studiului (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.
13. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză se utilizează pentru testarea funcției cognitive la adulții tineri (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib). Dintre acestea, 10 animale/sex/grup (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) sunt sacrificate la încheierea studiului, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.

Tabelul 3

| Puiul nr. <sup>(a)</sup> |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test   |
|--------------------------|---|--------------------------------|--|
| m                        | f |                                |  |
| 1                        | 5 | 10 m + 10 f                    | PND 11 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | PND 11 greutatea creierului                            |
| 2                        | 6 | 20 m + 20 f                    | Ontogeneza comportamentului (activitatea motorie)      |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Activitatea motorie                                    |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Maturizarea sexuală                                    |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Învățarea și memoria (PND 27)                          |

▼ **M5**

| Puiul nr. <sup>(a)</sup> |   | Nr. de pui alocați pentru test | Examinare/Test  |
|--------------------------|---|--------------------------------|---|
| m                        | f |                                |   |
| 3                        | 7 | 20 m + 20 f                    | Reacție auditivă (adolescenți și adulți tineri)                           |
|                          |   | 20 m + 20 f                    | Observații clinice detaliate  |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | Greutatea/neuropatologia/morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70 |
| 4                        | 8 | 20 m + 20 f                    | Învățarea și memoria (adulți tineri)                                      |
|                          |   | 10 m + 10 f                    | Greutatea creierului la adultul tânăr                                     |

<sup>(a)</sup> Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.

**▼ M5***Apendicele 2***Definiții**

Substanță chimică: o substanță sau un amestec de substanțe.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec de substanțe testate utilizând prezenta metodă de testare.

## ▼ M5

**B.54. BIOTESTUL UTEROTROFIC LA ROZĂTOARE: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI ESTROGENICE**

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 440 (2007). OCDE a inițiat în 1998 o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibilelor perturbatori endocrini (1). Un element al activității a fost elaborarea de orientări privind testarea referitoare la biotestul uterotrofic la rozătoare. Ulterior, biotestul uterotrofic la rozătoare a fost supus unui amplu program de validare, inclusiv compilarea unui document de referință detaliat (2) (3) și desfășurarea de ample studii intra- și interlaboratoare pentru a demonstra relevanța și reproductibilitatea biotestului cu un estrogen de referință puternic, cu agoniști slabi ai receptorului de estrogen, cu un antagonist puternic al receptorului de estrogen, precum și cu o substanță chimică de referință (4) (5) (6) (7) (8) (9). Prezenta metodă de testare B.54 este rezultatul experienței dobândite în timpul programului de testare pentru validare și a rezultatelor astfel obținute cu agoniști cu efect estrogenic.
2. Biotestul uterotrofic este un test de depistare pe termen scurt care a început în anii 1930 (27) (28) și a fost standardizat mai întâi pentru depistare de către un comitet de experți în 1962 (32) (35). Acesta se bazează pe creșterea greutateii uterine sau a răspunsului uterotrofic (pentru prezentare, a se vedea punctul 29). Testul evaluează capacitatea unei substanțe chimice de a obține activități biologice compatibile cu agoniști sau antagoniști estrogenici naturali (de exemplu, 17 $\beta$ -estradiol); cu toate acestea, utilizarea sa pentru detectarea antagoniștilor este mult mai puțin frecventă decât pentru agoniști. Uterul răspunde la estrogeni în două moduri. Un răspuns inițial este o creștere în greutate datorată acumulării de apă. Acest răspuns este urmat de un câștig în greutate din cauza creșterii țesutului (30). Răspunsurile uterului la șobolani și la șoareci sunt comparabile din punct de vedere calitativ.
3. Biotestul uterotrofic servește ca test de depistare *in vivo* și aplicarea acestuia ar trebui să fie considerată în contextul „Cadrului conceptual OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini” (apendicele 2). În cadrul conceptual, biotestul uterotrofic este limitat la nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la un singur mecanism endocrin, și anume estrogenicitatea.
4. Biotestul uterotrofic este destinat să fie inclus într-o baterie de teste *in vitro* și *in vivo* pentru a identifica substanțele chimice cu potențial de a interacționa cu sistemul endocrin, conducând în cele din urmă la evaluări de risc pentru sănătatea umană sau pentru mediu. Programul de validare al OCDE a utilizat agoniști estrogenici atât puternici, cât și slabi pentru a evalua performanța testului pentru a identifica substanțe chimice cu efect estrogenic (4) (5) (6) (7) (8). Astfel, sensibilitatea procedurii de test pentru agoniștii estrogenici a fost bine demonstrată, pe lângă o bună reproductibilitate intra- și interlaboratoare.
5. În ceea ce privește substanțele chimice negative, doar o substanță chimică „negativă” de referință raportată deja negativ de testul uterotrofic, precum și de testele de receptori și testele *in vitro* de legare a receptorului a fost inclusă în programul de validare, însă date de testare suplimentare, care nu sunt legate de programul de validare al OCDE, au fost evaluate, sprijinind în continuare specificitatea biotestului uterotrofic pentru depistarea agoniștilor estrogenici (16).

## ▼ M5

## CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

6. Agoniștii și antagoniștii estrogenici acționează ca liganzi pentru receptorii de estrogen a și b și pot activa sau, respectiv, inhiba acțiunea transcripțională a receptorilor. Aceasta poate avea potențialul de a conduce la pericole pentru sănătate, inclusiv efecte asupra reproducerii și dezvoltării. Prin urmare, există necesitatea de a evalua și a analiza rapid o substanță chimică ca un posibil agonist sau antagonist estrogenic. Deși informativă, afinitatea unui ligand pentru un receptor de estrogen sau activarea transcripției genelor reporter *in vitro* este doar unul dintre mai mulți factori determinanți de posibil pericol. Alți factori determinanți pot include activarea și dezactivarea metabolică la intrarea în corp, distribuția către țesuturile țintă și eliminarea din corp, depinzând, cel puțin în parte, de calea de administrare și de produsul chimic testat. Acest lucru conduce la necesitatea de a depista posibila activitate a unei substanțe chimice *in vivo*, în condiții corespunzătoare, cu excepția cazului în care caracteristicile substanței chimice referitoare la absorbție — distribuție — metabolism — eliminare (ADME) oferă deja informații adecvate. Țesuturile uterine răspund cu o creștere rapidă și energetică la stimulare prin estrogeni, în special la rozătoarele de laborator, la care ciclul estral durează aproximativ 4 zile. Speciile de rozătoare, în special șobolanul, sunt utilizate, de asemenea, pe scară largă în studiile de toxicitate, în vederea caracterizării riscurilor. Prin urmare, uterul rozătoarelor este un organ țintă adecvat pentru depistarea *in vivo* a agoniștilor și antagoniștilor estrogenici.
  
7. Prezenta metodă de testare se bazează pe protocoalele utilizate în studiul de validare al OCDE, care s-au dovedit a fi fiabile și repetabile în studii intra- și interlaboratoare (5) (7). În prezent, sunt disponibile două metode, și anume, metoda femelelor adulte ovariectomizate (metoda adult-ovx) și metoda imaturelor neovariectomizate (metoda imatură). S-a demonstrat, în cadrul programului de teste de validare al OCDE, că ambele metode prezintă o sensibilitate și o reproductibilitate comparabile. Cu toate acestea, exemplarele imature, deoarece au un ax hipotalamo-pituitar-gonadal (HPG) intact, sunt oarecum mai puțin specifice, dar acoperă un domeniu de investigație mai extins decât animalele ovariectomizate, deoarece pot răspunde la substanțe chimice care interacționează cu axa HPG mai degrabă decât numai cu receptorul de estrogen. La șobolani, axa HPG este funcțională la aproximativ 15 zile. Înainte de această vârstă, pubertatea nu poate fi accelerată cu tratamente precum GnRH. Pe măsură ce femelele se apropie de pubertate, înainte de deschiderea vaginului, femela va avea mai multe cicluri silențioase care nu au drept rezultat deschiderea vaginului sau ovulația, dar există unele fluctuații hormonale. În cazul în care o substanță chimică stimulează axa HPG în mod direct sau indirect, rezultă pubertate precoce, ovulație timpurie și deschiderea accelerată a vaginului. Nu numai substanțele chimice care acționează asupra axei HPG au acest efect, ci și anumite tipuri de hrană cu niveluri mai ridicate de energie metabolizabilă decât altele stimulează creșterea și accelerează deschiderea vaginului, fără a fi substanțe cu efect estrogenic. Astfel de substanțe chimice nu ar determina un răspuns uterotrofic în animalele adulte OVX, deoarece axa HPG a acestora nu funcționează.
  
8. Din motive de bunăstare a animalelor, ar trebui să se acorde prioritate metodei care utilizează șobolani imaturi, evitând tratarea chirurgicală prealabilă a animalelor și o eventuală neutilizare a animalelor care dau semne că ar intra în ciclul estral (a se vedea punctul 30).



## ▼ M5

9. Răspunsul uterotrofic nu este în întregime de origine estrogenică, însemnând că substanțe chimice altele decât agoniștii sau antagoniștii estrogenici pot, de asemenea, să provoace o reacție. De exemplu, doze relativ mari de progesteron, testosteron sau diferite tipuri sintetice de progestin pot conduce la o reacție stimulatorie (30). Orice reacție poate fi analizată din punct de vedere histologic pentru cheratinizarea și cornificarea vaginului (30). Indiferent de originea posibilă a reacției, un rezultat pozitiv al unui biotest uterotrofic ar trebui, în mod normal, să inițieze acțiuni pentru clarificare suplimentară. Dovezi suplimentare de estrogenicitate ar putea proveni din teste *in vitro*, cum ar fi testele de legare ER și testele de activare transcripțională, sau din alte teste *in vivo*, precum testarea femelelor la pubertate.
  
10. Luând în considerare faptul că biotestul uterotrofic servește ca test de depistare *in vivo*, abordarea de validare adoptată a servit atât considerentelor de bunăstare a animalelor, cât și unei strategii de testare secvențială. În acest scop, efortul s-a concentrat asupra validării riguroase a reproductibilității și a sensibilității pentru estrogenicitate — principala preocupare pentru multe substanțe chimice, în timp ce puține eforturi au fost direcționate către componenta de antiestrogenicitate a testului. A fost testat doar un singur antiestrogen cu activitate puternică, având în vedere faptul că numărul de produse chimice cu un profil antiestrogenic clar (neacoperite de o anumită activitate estrogenică) este foarte limitat. Astfel, metoda de testare este dedicată protocolului estrogenic, în timp ce protocolul care descrie modul antagonist al testării este inclus într-un document de orientare (37). Reproducibilitatea și sensibilitatea testului pentru substanțele chimice cu activitate pur antiestrogenică vor fi definite mai clar ulterior, după ce procedura de testare este în funcțiune pentru o anumită perioadă de timp și sunt identificate mai multe substanțe chimice cu această modalitate de acțiune.
  
11. Este recunoscut faptul că toate procedurile bazate pe animale trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator; descrierile îngrijirii și ale tratamentului prezentate mai jos sunt standarde minime de performanță și sunt prevalente de reglementările locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (38). OCDE oferă orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor de laborator (25).
  
12. Precum în toate testele care utilizează animale vii, este esențial să se asigure că datele sunt într-adevăr necesare, înainte de începerea testului. De exemplu, datele pot fi necesare în următoarele două condiții:
  - potențial ridicat de expunere (nivelul 1 al cadrului conceptual, apendicele 2) sau indicații pentru estrogenicitate (nivelul 2), pentru a investiga dacă efectele pot să apară *in vivo*;
  - efecte care indică estrogenicitate în testele *in vivo* de nivelul 4 sau 5 susținând ipoteza că efectele au fost legate de un mecanism estrogenic care nu poate fi elucidat utilizând un test *in vitro*.
  
13. Definițiile utilizate în prezenta metodă de testare sunt prezentate în apendicele 1.

▼ **M5****PRINCIPIUL TESTULUI**

14. Biotestul uterotrofic se bazează pentru sensibilitatea sa pe un sistem de testare pe animale la care axul hipotalamo-pituitar-ovarian nu este funcțional, ceea ce generează niveluri endogene scăzute de estrogen aflat în circulație. Acest fapt va asigura un nivel de referință scăzut al greutății uterului și o limită maximă de răspuns la estrogenii administrați. Două stări sensibile la estrogen în rândul rozătoarelor femele îndeplinesc această cerință:

- (i) femele imature după înțărare și înainte de pubertate; și
- (ii) femele adulte tinere după ovariectomie cu suficient timp pentru ca țesuturile uterine să regreseze.

15. Substanța de testat se administrează zilnic, prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. Se administrează doze gradate de substanță de testat la un minim de două grupuri de tratament (a se vedea punctul 33 pentru orientare) de animale de experiență, utilizând un singur nivel de doză pe grup și o perioadă de administrare de trei zile consecutive pentru metoda imaturilor sau o perioadă de administrare minimă de trei zile consecutive pentru metoda adulților OVX. Animalele sunt supuse autopsiei la aproximativ 24 de ore după ultima administrare. Pentru agoniștii estrogenici, media greutății uterului la grupurile de animale tratate în raport cu grupul tratat cu vehicul este evaluată pentru o creștere semnificativă din punct de vedere statistic. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic a mediei greutății uterului la un grup de tratament indică un răspuns pozitiv la biotest.

**DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciilor de animale**

16. Se pot utiliza sușe de rozătoare folosite în mod normal în laborator. De exemplu, în timpul validării s-au utilizat sușele de șobolani Sprague-Dawley și Wistar. Nu se utilizează sușe cu utere cunoscute sau suspectate a fi mai puțin receptive. Laboratorul trebuie să demonstreze sensibilitatea sușei utilizate, astfel cum se specifică la punctele 26 și 27.
17. Șobolanul și șoarecele au fost utilizați în mod obișnuit în biotestul uterotrofic încă din anii 1930. Studiile de validare ale OCDE au fost realizate numai cu șobolani, pe baza unei înțelegeri a faptului că este de așteptat ca ambele specii să fie echivalente și, prin urmare, o specie ar trebui să fie suficientă pentru validare la nivel mondial în vederea economisirii resurselor și a animalelor. Șobolanul este specia aleasă în majoritatea studiilor de toxicitate asupra reproducerii și dezvoltării. Luând în considerare faptul că există o vastă bază de date istorice pentru șoareci și, prin urmare, pentru a extinde sfera metodei biotestului uterotrofic la rozătoare la utilizarea șoarecilor ca specie de testare, s-a efectuat un studiu limitat de validare suplimentar la șoareci (16). S-a selectat o abordare comparativă cu un număr limitat de substanțe chimice de testat, laboratoare participante și fără testare prin eșantionare codificată, în conformitate cu intenția inițială de a economisi resurse și animale. Studiul de validare comparativ arată pentru biotestul uterotrofic la șoareci femele adulte tinere ovariectomizate că, din punct de vedere calitativ și cantitativ, datele obținute la șobolani și la șoareci corespund unele cu altele. Deși rezultatul biotestului uterotrofic poate fi preliminar unui studiu pe termen lung, acesta permite ca animale din aceeași sușă și din aceeași sursă să fie utilizate în ambele studii. Abordarea comparativă s-a limitat la șoareci OVX și raportul nu furnizează un set solid de date pentru a valida modelul imatur, prin urmare, modelul imatur la șoareci nu este considerat în domeniul de aplicare a prezentei metode de testare.

## ▼ M5

18. În consecință, în anumite cazuri se pot utiliza șoareci în locul șobolanilor. Trebuie oferită o justificare pentru utilizarea acestei specii, pe baza unor criterii toxicologice, farmacocinetice și/sau de alt tip. Pentru șoareci, ar putea fi necesare modificări ale protocolului. De exemplu, consumul de hrană al șoarecilor în funcție de greutatea corporală este mai mare decât cel al șobolanilor și, prin urmare, conținutul de fitoestrogen din hrană ar trebui să fie mai mic pentru șoareci decât pentru șobolani (9) (20) (22).

**Condiții de adăpostire și hrănire**

19. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator. Descrierile îngrijirii și ale tratamentului sunt standarde minime și sunt prevalente de reglementări locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (38). În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (cu un interval aproximativ  $\pm 3$  °C). Se asigură o umiditate relativă cu valoarea minimă de 30 % și cu valoarea maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Obiectivul ar fi o umiditate relativă de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial. Alternanța zilnică a iluminatului trebuie să fie de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric.
20. Hrana de laborator și apa potabilă se furnizează *ad libitum*. Animalele adulte tinere pot fi adăpostite individual sau în cuști în grupuri de până la trei animale. Din cauza vârstei fragede a animalelor imature, se recomandă adăpostirea în grup social.
21. Se știe că nivelurile ridicate de fitoestrogeni în hrana de laborator au ca efect creșterea greutateii uterului la rozătoare într-o măsură suficient de mare pentru a interfera cu biotestul uterotrofic (13) (14) (15). Nivelurile ridicate de fitoestrogeni și de energie metabolizabilă în tipurile de hrană de laborator pot conduce, de asemenea, la pubertate prematură, în cazul în care sunt utilizate animale imature. Prezența fitoestrogenilor rezultă, în principal, din includerea de produse din soia și lucernă în tipurile de hrană de laborator și s-a dovedit că concentrațiile de fitoestrogeni variază de la un lot la altul de hrană standard de laborator (23). Greutatea corporală este o variabilă importantă deoarece cantitatea de hrană consumată este legată de greutatea corporală. Prin urmare, nivelul real al dozei de fitoestrogen consumat din aceeași hrană poate varia în funcție de specie și de vârstă (9). Pentru șobolani femele imature, consumul de hrană în funcție de greutatea corporală poate fi aproximativ dublu față de cel al femelelor adulte tinere ovariectomizate. Pentru șoarecii adulți tineri, consumul de hrană în funcție de greutatea corporală poate fi de aproximativ patru ori cel al femelelor șobolan adulte tinere ovariectomizate.
22. Cu toate acestea, rezultatele biotestului uterotrofic (9) (17) (18) (19) arată că anumite cantități limitate de fitoestrogeni alimentari sunt acceptabile și nu reduc sensibilitatea biotestului. Ca orientare, nivelurile alimentare ale fitoestrogenilor nu trebuie să depășească 350 μg de echivalente de genistein/gram de hrană de laborator pentru femelele imature de șobolani Sprague Dawley și Wistar (6) (9). Regimurile alimentare trebuie, de asemenea, să fie adecvate atunci când testarea are loc pe femele de șobolani ovariectomizate adulte tinere, întrucât consumul alimentar în funcție de greutatea corporală este mai mic la tinerii adulți decât la animalele imature. Dacă se utilizează șoareci ovariectomizați sau șobolani mai sensibili la fitoestrogen, se analizează reducerea proporțională a nivelurilor de fitoestrogen alimentar (20). De asemenea, diferențele între energia metabolică disponibilă din diferite regimuri alimentare pot conduce la schimbări temporale privind începerea pubertății (21) (22).

## ▼ M5

23. Înainte de studiu, este necesară selecția atentă a unui regim alimentar fără un nivel ridicat de fitoestrogeni [pentru orientări, a se vedea (6) (9)] sau de energie metabolizabilă, care pot afecta rezultatele (15) (17) (19) (22) (36). Asigurarea respectării corespunzătoare a sistemului de testare utilizat de laborator, astfel cum este specificat la punctele 26 și 27, este o metodă importantă de îndeplinire a ambilor factori. Ca măsură de protecție, în conformitate cu bunele practici de laborator (BPL), se realizează prelevarea de probe reprezentative din fiecare lot de hrană administrată în timpul studiului pentru eventuala analiză a conținutului de fitoestrogen (de exemplu, în cazul unei greutăți uterine ridicate în raport cu datele istorice privind grupurile martor sau un răspuns inadecvat la estrogenul de referință, 17 alfa-etinilestradiol). Alicotele se analizează ca parte a studiului sau congelate la – 20 °C sau astfel încât să se împiedice descompunerea probei înainte de analiză.
24. Unele materiale de așternut pot conține substanțe cu efect estrogenic care apar în mod natural sau substanțe chimice cu efect antiestrogenic (de exemplu, se știe că știuletele de porumb afectează ciclicitatea șobolanilor și pare să aibă efect antiestrogenic). Materialele de așternut selectate trebuie să conțină un nivel minim de fitoestrogeni.

**Pregătirea animalelor**

25. Animalele de laborator fără semne de boală sau anormalități fizice se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile se aranjează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate amplasării acestora. Animalele trebuie identificate individual. De preferință, animalele imature se plasează în cuști cu mame sau mame adoptive până la înțarcare în timpul acclimatizării. Perioada de acclimatizare înainte de începerea studiului ar trebui să fie de aproximativ 5 zile pentru animalele adulte tinere și pentru animalele imature livrate cu mame sau mame adoptive. În cazul în care animalele imature sunt obținute ca pui înțărcați fără mame, este posibil să fie necesară o perioadă de acclimatizare mai scurtă, întrucât administrarea trebuie să înceapă imediat după înțarcare (a se vedea punctul 29).

**PROCEDURĂ****Verificarea competenței laboratorului**

26. Pentru a verifica competența laboratorului, se pot utiliza două opțiuni diferite:
- verificarea periodică, pe baza unui studiu inițial de control pozitiv cu valori de referință (a se vedea punctul 27). Cel puțin o dată la 6 luni și de fiecare dată când are loc o modificare care poate influența performanța testării (de exemplu, o nouă formulare a regimului alimentar, modificări la nivelul personalului care efectuează disecțiile, schimbarea sușei sau a furnizorului de animale etc.), se verifică capacitatea de reacție a sistemului de testare (modelul animal) utilizând o doză corespunzătoare (pe baza studiului de martor pozitiv de referință descris la punctul 27) a unui estrogen de referință: 17a-etinilestradiol (CAS nr. 57-63-6) (EE);
  - utilizarea de controale simultane, prin includerea unui grup căruia i se administrează o doză corespunzătoare de estrogen de referință în fiecare test.

În cazul în care sistemul nu reacționează astfel cum se preconizează, condițiile de experiență sunt examinate și modificate în consecință. Se recomandă ca doza de estrogen de referință care va fi utilizată în cadrul ambelor metode să fie aproximativ ED 70-80.

▼ **M5**

27. **Studiul de martor pozitiv de referință** — Înainte ca un laborator să efectueze un studiu utilizând pentru prima dată prezenta metodă de testare, trebuie să se demonstreze competența laboratorului prin testarea reactivității modelului animal, stabilind răspunsul la o doză de estrogen de referință: 17 $\alpha$ -etinilestradiol (CAS nr. 57-63-6) (EE) cu un număr minim de patru doze. Reacția legată de greutatea uterului se va compara cu datele istorice [a se vedea referința bibliografică (5)]. În cazul în care studiul de martor pozitiv de referință nu produce rezultatele anticipate, sunt examinate și modificate condițiile experimentale.

**Numărul și starea animalelor**

28. Fiecare grup tratat și fiecare grup martor trebuie să includă cel puțin 6 animale (atât pentru protocoalele metodei imature, cât și pentru metoda adult-OVX).

**Vârsta animalelor imature**

29. Pentru biotestul uterotrofic cu animale imature, se specifică ziua fătării. Administrarea trebuie să înceapă suficient de devreme pentru a se asigura că, la sfârșitul administrării substanței chimice de testat, nu a avut încă loc creșterea fiziologică a estrogenilor endogeni asociată cu pubertatea. Pe de altă parte, există dovezi că animalele foarte tinere pot fi mai puțin sensibile. Pentru definirea vârstei optime, fiecare laborator trebuie să ia în considerare propriile date generale privind maturarea.

De regulă, administrarea tratamentului la șobolani poate începe imediat după înțărirea prematură în ziua 18 după fătare (ziua fătării fiind ziua 0 după fătare). La șobolani, este preferabil ca administrarea să se efectueze în ziua 21 după fătare, dar, în orice caz, înainte de ziua 25 după fătare, întrucât, după această vârstă, axul hipotalamo-pituitar-ovarian devine funcțional, iar nivelurile de estrogen endogen pot începe să crească, cu o creștere concomitentă a greutateii de referință a uterului și o creștere a deviațiilor standard ale grupului (2) (3) (10) (11) (12).

**Procedura pentru ovariectomie**

30. Pentru femele ovariectomizate de șobolani și de șoareci (grupurile martor și de tratament), ovariectomia se efectuează între 6 și 8 săptămâni. Pentru șobolani, trebuie să existe un interval de minimum 14 de zile între ovariectomie și prima zi de administrare pentru a permite uterului să se retragă până la un nivel de referință stabil minim. Pentru șoareci, trebuie să treacă cel puțin 7 zile între ovariectomie și prima zi de administrare. Întrucât cantități mici de țesut ovarian sunt suficiente pentru a produce niveluri semnificative de estrogeni aflate în circulație (3), animalele sunt testate înainte de utilizare prin observarea celulelor epiteliale prelevate prin tamponare din vagin pe parcursul a cel puțin cinci zile consecutive (de exemplu, pentru șobolani, zilele 10-14 după ovariectomie). În cazul în care animalele manifestă semne că ar intra în ciclul estral, acestea nu sunt utilizate. De asemenea, în momentul autopsiei, se examinează resturile ovariene pentru orice dovadă a existenței de țesut ovarian. În acest caz, animalul nu se utilizează în calcule (3).
31. Începerea procedurii de ovariectomie se face cu animalul în poziție culcată ventrală, după ce acesta a fost anesteziat în mod corespunzător. Incizia de deschidere de aproximativ 1 cm a peretelui abdominal dorso-lateral se realizează longitudinal, la mijlocul distanței dintre marginea inferioară costală și creasta iliacă și câțiva milimetri lateral de marginea laterală a mușchiului lombar. Ovarul se îndepărtează din cavitatea abdominală pe un câmp aseptice. Ovarul se separă la joncțiunea dintre oviduct și organismul uterin. După ce se confirmă că nu există o sângerare masivă, peretele abdominal se închide prin suturi și pielea este închisă cu autoclipsuri sau sutură corespunzătoare. Punctele de ligatură sunt prezentate schematic în figura 1. Se utilizează analgezice postoperatorii adecvate, conform recomandării unui medic veterinar cu experiență în îngrijirea rozătoarelor.

## ▼ M5

**Greutatea corporală**

32. În metoda adult-OVX, greutatea corporală și greutatea uterului nu sunt corelate, deoarece greutatea uterului este afectată de hormoni precum estrogenii, dar nu și de factori de creștere care reglementează dimensiunea corporală. Dimpotrivă, greutatea corporală este legată de greutatea uterului în modelul imatur, în timp ce acesta se maturizează (34). Astfel, la începutul studiului, diferențele de greutate între animalele utilizate în modelul imatur trebuie să fie minime și să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie. Aceasta înseamnă că dimensiunea cuibului trebuie să fie standardizată de crescător, pentru a se asigura că puii de la diferite animale materne vor fi hrăniți aproximativ la fel. Animalele trebuie distribuite în grupuri (atât grupuri martor, cât și grupuri tratate) prin distribuirea aleatorie a greutateii, astfel încât greutatea medie a fiecărui grup să nu fie diferită din punct de vedere statistic de cea a oricărui alt grup. Ar trebui să se acorde atenție pentru a evita, pe cât posibil, atribuirea unor pui din același cuib în același grup de tratament, fără a crește numărul de cuiburi care urmează să fie utilizate pentru investigație.

**Dozare**

33. Pentru a stabili dacă o substanță chimică de testat poate avea efect estrogenic *in vivo*, două grupuri de tratament și un grup martor sunt în mod normal suficiente și, prin urmare, acest concept este preferat, din motive de bunăstare a animalelor. În cazul în care scopul este de a obține o curbă doză-răspuns sau pentru a extrapola la doze mai mici, sunt necesare cel puțin 3 grupuri de tratament. În cazul în care sunt necesare mai multe informații în afară de identificarea activității estrogenice (cum ar fi o estimare a potenței), ar trebui să fie luat în considerare un regim de administrare diferit. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate. Dacă se folosește un vehicul la administrarea substanței de testat, grupul martor trebuie să primească aceeași cantitate de vehicul utilizată la grupurile tratate (sau cel mai mare volum utilizat la grupurile tratate, dacă acesta diferă între grupuri).
34. Obiectivul în cazul biotestului uterotrofic este selectarea de doze care să garanteze supraviețuirea animalelor și care nu prezintă toxicitate semnificativă sau suferință pentru animale după trei zile consecutive de administrare a substanței chimice până la o doză maximă de 1 000 mg/kg/zi. Toate dozele se propun și se selecționează ținându-se cont de toate datele existente privind toxicitatea și datele (toxico)cinetice disponibile pentru substanța testată sau materialele asociate. Nivelul cel mai ridicat de doză trebuie să țină seama, în primul rând, de informații privind LD<sub>50</sub> și/sau toxicitatea acută pentru a evita decesul, suferințe grave sau stresarea animalelor (24) (25) (26). Cea mai mare doză reprezintă doza maximă tolerată (DMT); s-ar accepta, de asemenea, un studiu efectuat la un nivel al dozei care a indus o reacție uterotrofică pozitivă. Ca partajare, sunt în general acceptabile intervale mari (de exemplu, o semiunitate logaritmică corespunzătoare unei progresii a dozei de 3,2 sau chiar până la o unitate logaritmică) între doze. Dacă nu există informații relevante disponibile, se poate realiza un studiu preliminar pentru stabilirea nivelurilor dozelor cu scopul de a contribui la stabilirea dozelor de administrat.
35. Alternativ, în cazul în care potența estrogenică a unui agonist poate fi estimată utilizând date *in vitro* (sau *in silico*), acestea pot fi luate în considerare pentru selectarea dozei. De exemplu, cantitatea de substanță de testat care ar produce reacții uterotroifice echivalente cu agonistul de referință (etinilestradiol) este estimată prin potențialele sale relative *in vitro* la etinilestradiol. Cea mai mare doză de test ar fi obținută prin multiplicarea dozei echivalente cu un factor corespunzător, de exemplu 10 sau 100.

## ▼ M5

**Considerații privind stabilirea nivelurilor dozelor**

36. În cazul în care este necesar, se poate efectua un studiu preliminar pentru stabilirea nivelurilor dozelor pe câteva animale. În acest sens, se poate utiliza documentul de orientare nr. 19 al OCDE (25) care definește semnele clinice care indică toxicitate sau suferința animalelor. În cazul în care este posibil în cadrul studiului de stabilire a nivelurilor dozelor, după trei zile de administrare, uterele pot fi excizate și cântărite aproximativ la 24 de ore după administrarea ultimei doze. Datele pot fi utilizate ulterior pentru a contribui la conceperea studiului principal (selectarea dozelor maxime acceptabile și a dozelor scăzute și recomandarea numărului de grupuri tratate).

**Administrarea dozelor**

37. Substanța de testat se administrează prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. La alegerea căii de administrare, se ține seama de considerente legate de bunăstarea animalelor, precum și de aspecte toxicologice, cum ar fi relevanța pentru calea de expunere umană la substanța chimică (de exemplu, oral prin gavaj la modelul de ingerare, injectare subcutanată la modelul de inhalare sau adsorbție cutanată), proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat și, în special, informațiile toxicologice existente și datele cu privire la metabolism și cinetică (de exemplu, necesitatea de a evita primul pasaj metabolic, o mai bună eficiență prin utilizarea unei anumite căi).
38. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase. Cu toate acestea, deoarece majoritatea liganzilor estrogenului sau precursorii lor metabolici tind să fie hidrofobi, cea mai comună abordare este de a utiliza o soluție/suspensie în ulei (de exemplu, ulei de porumb, de arahide, de susan sau de măsline). Cu toate acestea, astfel de uleiuri au conținuturi calorice și de grăsime diferite, astfel că vehiculul ar putea afecta energia metabolizabilă (EM) totală, ceea ce ar putea afecta obiectivele măsurate, cum ar fi greutatea uterului, în special în cadrul metodei imature (33). Prin urmare, înainte de studiu, orice vehicul care va fi utilizat se testează în comparație cu grupuri martor fără vehicule. Substanțele chimice de testat se pot dizolva într-o cantitate minimă de etanol 95 % sau alți solvenți adecvați și pot fi diluate la concentrații de lucru finale în vehiculul testat. Trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale solventului și acesta se testează într-un grup martor separat numai cu solvent. În cazul în care substanța de testat este considerată stabilă, se poate utiliza o încălzire ușoară și acțiune mecanică viguroasă pentru a contribui la dizolvarea substanței de testat. Trebuie să se determine stabilitatea substanței de testat în vehicul. În cazul în care substanța de testat este stabilă pe durata studiului, se poate prepara o alicotă de pornire din substanța de testat, iar diluțiile de dozare specificate se prepară zilnic.
39. Calendarul de dozare va depinde de modelul utilizat (a se vedea punctul 29 pentru modelul imatur și punctul 30 pentru modelul adult-OVX). Șobolanilor femele imature li se administrează substanța de testat zilnic timp de trei zile consecutive. Un tratament de trei zile se recomandă, de asemenea, pentru șobolanii femele ovariectomizate, dar expuneri mai lungi sunt acceptabile și pot îmbunătăți detectarea substanțelor chimice slab active. La șoarecii femele ovariectomizate, perioada de aplicare de 3 zile este suficientă, fără un avantaj semnificativ al unei extinderi de până la șapte zile pentru agoniști estrogenici puternici; cu toate acestea, o astfel de relație nu a fost demonstrată pentru estrogenii slabi în studiul de validare (16), prin urmare, administrarea ar trebui prelungită până la 7 zile consecutive la șoarecii adulți-OVX. Doza se administrează aproximativ în același moment al zilei. Aceasta trebuie să se ajusteze, după cum este necesar, pentru a menține un nivel de doză constant în raport cu greutatea corporală a animalului (de exemplu, mg de substanță chimică de testat per kg de greutate corporală pe zi). În ceea ce privește volumul probei, caracterul variabil al acesteia, în funcție de greutatea corporală, ar trebui să fie redus la minimum prin ajustarea concentrației soluției de tratament pentru a se asigura un volum constant în funcție de greutatea corporală la toate nivelurile dozei și pentru toate căile de administrare.



▼ **M5**

40. În cazul în care substanța de testat se administrează prin gavaj, aceasta ar trebui să se administreze animalelor într-o singură doză zilnică, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat odată depinde de dimensiunea animalului de laborator. Trebuie să se urmeze orientările locale privind îngrijirea animalelor, dar volumul nu trebuie să depășească 5 ml/kg masă corporală, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care se pot utiliza 10 ml/kg masă corporală.
41. În cazul în care substanța de testat se administrează prin injectare subcutanată, acest lucru se realizează într-o singură doză zilnică. Dozele se administrează în regiunile dorso-scapulare sau lombare cu un ac steril (de exemplu, cu grosimea 23 sau 25) și o seringă pentru tuberculină. Raderea zonei de injectare este opțională. Se notează eventualele pierderi, scurgeri la punctul de injectare sau administrarea incompletă. Volumul total injectat per șobolan pe zi nu trebuie să depășească 5 ml/kg greutate corporală, împărțit în două locuri de injectare, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care pot fi utilizate 10 ml/kg greutate corporală.

**Observații***Observații clinice și generale*

42. Se recomandă realizarea de observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și chiar mai frecvent în cazul în care se observă semne de toxicitate. Observațiile se efectuează, de preferință, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Toate animalele sunt observate pentru simptome de mortalitate, morbiditate și semne clinice generale, cum ar fi schimbări la nivelul comportamentului, al pielii, blănnii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, respirația anormală).

*Greutatea corporală și consumul de hrană*

43. Toate animalele se cântăresc zilnic cu o precizie de 0,1 g, începând chiar înainte de inițierea tratamentului, și anume, atunci când animalele sunt distribuite în grupuri. Ca măsurare opțională, se poate cântări cantitatea de alimente consumate per cușcă în perioada tratamentului prin cântărirea alimentatoarelor. Rezultatele consumului alimentar se exprimă în grame pe șobolan pe zi.

*Disecția și măsurarea greutății uterului*

44. Șobolanii sunt eutanasiați la douăzeci și patru de ore de la ultimul tratament. În mod ideal, ordinea autopsiei va fi aleatorie între grupuri pentru a evita progresia directă în sus sau în jos în grupurile tratate care ar putea afecta datele în mod subtil. Obiectivul biotestului este de a măsura greutatea uterului atât umed, cât și tamponat. Greutatea umedă include uterul și conținutul de fluid luminal. Greutatea tamponată este măsurată după ce conținutul luminal al uterului a fost exprimat și îndepărtat.
45. Înainte de disecție, vaginul va fi examinat pentru detectarea nivelului de deschidere la animalele imature. Procedura de disecție începe prin deschiderea peretelui abdominal începând de la simfiza pubiană. Ulterior, cornul și ovarele uterine, dacă sunt prezente, sunt desprinse de peretele abdominal dorsal. Vezica urinară și ureterele sunt îndepărtate de pe partea ventrală și laterală a uterului și a vaginului. Adeziunea fibroasă dintre rect și vagin se desprinde până când se pot identifica joncțiunea orificiului vaginal și pielea perineală. Uterul și vaginul sunt desprinse din corp prin incizia peretelui vaginal chiar deasupra joncțiunii dintre pielea perineală, astfel cum se arată în figura 2. Uterul se desprinde de peretele corpului prin



▼ **M5**

tăierea cu grijă a mezenterului uterin la punctul de fixare a acestuia pe întreaga lungime a părții dorso-laterale a fiecărui corn uterin. După îndepărtarea din organism, manipularea uterului trebuie să fie suficient de rapidă pentru a evita deshidratarea țesuturilor. Pierderea de greutate datorată uscării devine mai importantă la țesuturile mici precum uterul (23). În cazul în care sunt prezente, ovarele sunt eliminate la nivelul oviductului, evitând pierderea de fluid luminal din cornul uterin. În cazul în care animalul a fost ovariectomizat, resturile se examinează pentru detectarea prezenței oricăror țesuturi ovariene. Se îndepărtează excesul de grăsime și țesut conjunctiv. Vaginul este îndepărtat din uter chiar sub colul uterin, astfel încât colul uterin să rămână cu corpul uterin, astfel cum se arată în figura 2.

46. Fiecare uter ar trebui transferat într-un recipient cântărit și marcat în mod unic (de exemplu, un vas petri sau din material plastic), acordându-se atenție în continuare pentru a evita deshidratarea înainte de cântărire (de exemplu, în recipient se poate plasa hârtie de filtru ușor umezită cu soluție salină). Uterul cu fluid luminal se cântărește cu o precizie de 0,1 mg (greutatea uterului umed).
47. Fiecare uter va fi prelucrat apoi în mod individual pentru a elimina fluidul luminal. Ambele coarne uterine vor fi perforate sau tăiate longitudinal. Uterul va fi amplasat pe hârtie de filtru ușor umezită (de exemplu, Whatman nr. 3) și apăsător ușor cu o a doua bucată de hârtie de filtru umezită pentru a elimina complet fluidul luminal. Uterul fără conținutul luminal se cântărește cu o precizie de 0,1 mg (greutatea uterului tamponat).
48. Greutatea uterului la sacrificare poate fi utilizată pentru a se asigura că nu s-a depășit vârsta corespunzătoare la șobolanul intact imatur, cu toate acestea, datele istorice ale sușei de șobolan utilizate de laborator sunt decisive în acest sens (a se vedea punctul 56 pentru interpretarea rezultatelor).

#### *Investigații opționale*

49. După cântărire, uterul poate fi fixat în formol 10 % tamponat neutru pentru a fi examinat histopatologic după colorarea cu hematoxină și eozină (HE). Vaginul poate fi examinat în consecință (a se vedea punctul 9). În plus, se poate realiza măsurarea morfometrică a epiteliului endometrial pentru comparație cantitativă.

#### **DATE ȘI RAPORT**

##### **Date**

50. Datele studiului ar trebui să includă:

- numărul de animale la începutul testului;
- numărul și identitatea animalelor găsite moarte în timpul testului sau sacrificate pentru a nu suferi, precum și data și ora fiecăror decese și eutanasier;
- numărul și identitatea animalelor care prezintă semne de toxicitate, precum și o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și severitatea oricăror efecte toxice; și
- numărul și identitatea animalelor care prezintă vreo leziune și o descriere a tipului de leziuni.

▼ **M5**

51. Se consemnează datele individuale ale animalelor în ceea ce privește greutatea corporală, greutatea uterului umed și greutatea uterului tamponat. Se utilizează analizele statistice unilaterale ale agoniștilor pentru a determina dacă administrarea unui produs chimic de testare a condus la o creștere semnificativă statistic ( $p < 0,05$ ) a greutății uterine. Se efectuează analize statistice corespunzătoare pentru a studia modificările legate de tratament la nivelul greutății uterului umed și tamponat. De exemplu, datele pot fi evaluate printr-o abordare de analiză de covarianță (ANCOVA), cu greutatea corporală la autopsie drept covariabilă. Se poate efectua o transformare logaritmică de stabilizare a varianței asupra datelor uterine înainte de analiza datelor. Testul Dunnett și Hsu este adecvat pentru efectuarea de comparații între perechi ale fiecărui grup tratat raportat la grupul martor pentru vehicul și pentru calcularea intervalelor de încredere. Reprezentarea grafică a rezidualelor studentizate pot fi utilizate pentru detectarea eventualelor valori aberante și pentru evaluarea omogenității varianțelor. Procedurile respective au fost aplicate în cadrul programului de validare al OCDE, utilizând PROC GLM în SAS (*Statistical Analysis System*) (Institutul SAS, Cary, NC), versiunea 8 (6) (7).

52. Un raport final va include:

*Unitatea de testare:*

- personalul responsabil și responsabilitățile acestuia în cadrul studiului;
- datele de la testul cu martor pozitiv de referință și datele martor pozitiv periodice (a se vedea punctele 26 și 27).

*Substanța chimică de testat:*

- caracterizarea substanțelor de testat;
- natura fizică și, acolo unde este cazul, proprietățile fizico-chimice;
- metoda și frecvența de preparare a diluțiilor;
- toate informațiile obținute cu privire la stabilitate;
- toate analizele soluțiilor de dozare.

*Vehicul:*

- caracterizarea vehiculului de testare (natura, furnizorul și lotul);
- justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

*Animale de laborator:*

- specia și sușa și justificarea alegerii acestora;
- furnizorul și unitatea specifică furnizorului;
- vârsta la furnizare cu data fătării;
- în cazul animalelor imature, dacă sunt furnizate cu sau fără mamă sau mamă adoptivă și data înfărcării;
- detalii privind procedura de acclimatizare a animalelor;
- numărul animalelor per cușcă;
- detalii și metoda de identificare a fiecărui animal și a grupului.

*Condiții de testare:*

- detalii privind procesul de selecție aleatorie (și anume, metoda utilizată);
- justificarea alegerii dozei;

**▼ M5**

- detalii privind prepararea substanței de testat, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea;
- detalii privind administrarea substanței de testat și justificarea alegerii căii de expunere;
- hrana (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul și, dacă se cunosc, nivelurile de fitoestrogen);
- sursa de apă (de exemplu, apă de la robinet sau apă filtrată) și furnizare (prin tuburi de la un container mare, în sticle etc.);
- așternutul (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul);
- evidența condițiilor de plasare în cuști, intervalul de iluminat, temperatura și umiditatea spațiului, curățarea spațiului;
- descrierea detaliată a procedurilor de autopsie și de cântărire a greutății uterine;
- descrierea procedurilor statistice.

*Rezultate**Pentru fiecare animal:*

- toate greutatele corporale individuale zilnice (de la distribuirea în grupuri până la autopsie) (cu o precizie de 0,1 g);
- vârsta fiecărui animal (în zile, ziua fătării fiind considerată ziua 0) atunci când începe administrarea substanței de testat;
- data și ora fiecărei administrări a dozei;
- volumul calculat și dozajul administrat și observațiile cu privire la orice pierderi de dozaj în timpul sau ulterior administrării dozei;
- înregistrarea zilnică a stării animalelor, inclusiv simptome și observații relevante;
- presupusa cauză a decesului (în cazul în care animalul este descoperit în timpul studiului în stare muribundă sau mort);
- data și ora eutanasierii cu intervalul de timp până la ultima administrare a dozei;
- greutatea uterului umed (cu o precizie de 0,1 mg) și eventualele observații privind pierderile de fluid luminal în timpul disecției și a pregătirii pentru cântărire;
- greutatea uterului tamponat (cu o precizie de 0,1 mg).

*Pentru fiecare grup de animale:*

- greutatea corporală medie zilnică (cu o precizie de 0,1 g) și deviații standard (de la distribuirea în grupuri până la autopsie);
- greutatea medie a uterului umed și greutatea medie a uterului tamponat (cu o precizie de 0,1 mg) și deviațiile standard;
- în cazul în care se măsoară, consumul alimentar zilnic (calculat în grame de hrană consumată per animal);

▼ **M5**

- rezultatele analizelor statistice de comparare a greutății uterului umed și a greutății uterului tamponat la grupurile tratate în raport cu aceleași măsurători la grupurile martor pentru vehicul;
- rezultatele analizei statistice de comparare a greutății corporale totale și a creșterii în greutate la grupurile tratate în raport cu aceleași măsurători la grupurile martor pentru vehicul.

## 53. Rezumat al elementelor de orientare importante ale metodei de testare

|   | Șobolan  | Șoareci  |
|---|--|--|
| Animale   |  |  |
| Sușa  | Sușa de rozătoare de laborator utilizată în mod obișnuit   |  |
| Număr de animale                                      | Cel puțin 6 animale în fiecare grup tratat   |  |
| Număr de grupuri                                      | Cel puțin 2 grupuri de testare (a se vedea punctul 33 pentru orientare) și un grup martor negativ<br>Pentru îndrumări cu privire la grupurile martor pozitiv, a se vedea punctele 26 și 27 |  |
| Condiții de adăpostire și de hrănire                  |  |  |
| T° în încăperea în care se află animalele             | 22 °C ± 3 °C   |  |
| Umiditatea relativă                                   | 50-60 % și nu mai mică de 30 % sau mai mare de 70 %  |  |
| Alternanța zilnică a iluminatului                     | 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric  |  |
| Alimentația și apa potabile                           | Ad libitum   |  |
| Adăpost   | Individual sau în grupuri de până la trei animale (pentru animalele imature se recomandă adăpostirea în grup social)   |  |
| Alimentația și așternutul                             | Se recomandă un nivel scăzut de fitoestrogeni în alimentație și așternut   |  |
| Protocol  |  |  |
| Metodă  | Metoda imatură neovarietomizată (opțiunea preferată)<br>Metoda femelelor adulte ovariectomizate  | Metoda femelelor adulte ovariectomizate  |
| Vârsta administrării pentru animalele imature         | Cel mai devreme, PND 18. Tratarea trebuie să se finalizeze înainte de PND 25   | Nu este relevantă în domeniul de aplicare al prezentei metode de testare.          |
| Vârsta ovariectomiei                                  | Între 6 și 8 săptămâni.  |  |
| Vârsta administrării pentru animalele ovariectomizate | Între ovariectomie și prima zi de administrare trebuie să treacă cel puțin 14 zile.  | Între ovariectomie și prima zi de administrare trebuie să treacă cel puțin 7 zile. |
| Greutatea corporală                                   | Variația greutății corporale trebuie să fie minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie.   |  |

## ▼ M5

|                                   | Șobolan   | Șoareci                               |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|
| Administrare                      |   |                                       |
| Calea de administrare             | Gavaj oral sau injectare subcutanată  |                                       |
| Frecvența administrării           | Doză zilnică unică  |                                       |
| Volumul pentru gavaj și injectare | ≤ 5ml/kg greutate corporală (sau până la 10 ml/kg greutate corporală în cazul soluțiilor apoase) (în 2 două locuri de injectare pentru calea subcutanată) |                                       |
| Durata administrării              | 3 zile consecutive pentru modelul imatur<br>Cel puțin 3 zile consecutive pentru modelul OVX   | 7 zile consecutive pentru modelul OVX |
| Momentul autopsiei                | Aproximativ 24 de ore după ultima administrare  |                                       |
| Rezultate                         |   |                                       |
| Răspuns pozitiv                   | Creștere semnificativă din punct de vedere statistic a greutății medii a uterului (umed și/sau tamponat)  |                                       |
| Estrogen de referință             | 17α-etinilestradiol   |                                       |

## ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR

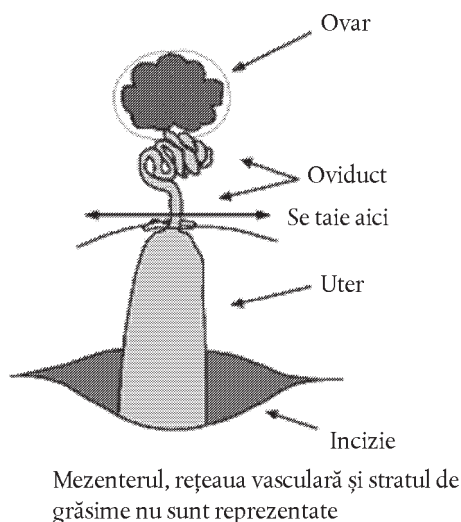
54. În general, un test pentru detectarea estrogenicității este considerat pozitiv în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a greutății uterului ( $p < 0,05$ ) cel puțin la niveluri mari de doze în comparație cu grupul martor pentru solvent. Un rezultat pozitiv este susținut, de asemenea, prin demonstrarea unei relații plauzibile din punct de vedere biologic și de magnitudinea răspunsului, având în vedere că activitățile estrogenice și antiestrogenice care se suprapun ale substanței chimice de testat pot afecta forma curbei doză-răspuns.
55. Trebuie să se acorde o atenție deosebită pentru a nu se depăși doza maximă tolerată, cu scopul de a permite o interpretare semnificativă a datelor. În acest sens, se analizează cu atenție reducerea greutății corporale, semnele clinice și alte constatări.
56. Un aspect important pentru acceptarea datelor din biotestul uterotrofic este greutatea uterină la animalele din grupul martor tratat cu vehicul. Valorile martor ridicate ar putea compromite capacitatea de reacție a biotestului și capacitatea de a detecta agoniștii estrogenici foarte slabi. Analiza literaturii de specialitate și datele obținute în cursul validării biotestului uterotrofic sugerează că, în special la animalele imature, cazurile unor valori medii martor ridicate nu apar spontan (2) (3) (6) (9). Întrucât greutatea uterului la șobolanii imaturi depinde de o serie de variabile, cum ar fi sușa sau greutatea corporală, nu se poate prevedea nicio limită superioară definitivă pentru greutatea uterului. Ca orientare, dacă greutatea uterului tamponat la șobolanii martor imaturi este cuprinsă între 40 și 45 mg, rezultatele ar trebui să fie considerate suspecte, iar greutatea uterului de peste 45 mg poate conduce la reluarea testului. Acest aspect se examinează însă de caz la caz (3) (6) (8). La testarea șobolanilor adulți, ovariectomia incompletă va lăsa țesuturi ovariene care pot produce estrogen endogen și pot întârzia regresia greutății uterului.

## ▼ M5

57. Greutatea uterului tamponat al grupului martor pentru vehicul sub 0,09 % din greutatea corporală pentru șobolanii femele imature și sub 0,04 % pentru femele adulte tinere ovariectomizate pare să producă rezultate acceptabile [a se vedea tabelul 31 (2)]. În cazul în care greutatea uterului are valori mai mari la grupul martor decât cifrele respective, se examinează diverși factori, inclusiv vârsta animalelor, ovariectomia corespunzătoare, fitoestrogeni alimentari etc., iar un rezultat negativ la test (niciun semn de activitate estrogenică) ar trebui utilizat cu prudență.
58. Datele istorice pentru grupurile martor se păstrează în laborator. Datele istorice pentru reacții la estrogeni de referință pozitivi, cum ar fi 17 $\alpha$ -etinilestradiol, se păstrează, de asemenea, în laborator. Laboratoarele pot testa, de asemenea, reacția la agonisti estrogenici slabi cunoscuți. Toate datele obținute pot fi comparate cu datele disponibile (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) pentru a se asigura că metodele laboratorului furnizează suficientă sensibilitate.
59. Valorile greutateii uterului tamponat au manifestat mai puțină variabilitate în cursul studiului de validare al OCDE decât valorile greutateii uterului umed (6) (7). Cu toate acestea, un răspuns semnificativ pentru oricare dintre măsurători ar indica faptul că substanța de testat este pozitivă pentru activitate estrogenică.
60. Răspunsul uterotrofic nu este în întregime de origine estrogenică; cu toate acestea, un rezultat pozitiv al biotestului uterotrofic este, în general, interpretat ca o dovadă de potențial estrogenic *in vivo* și, în mod normal, ar trebui să inițieze acțiuni pentru clarificări suplimentare (a se vedea punctul 9 și „Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini”, anexa 2).

Figura 1

Reprezentare schematică ilustrând îndepărtarea chirurgicală a ovarelor

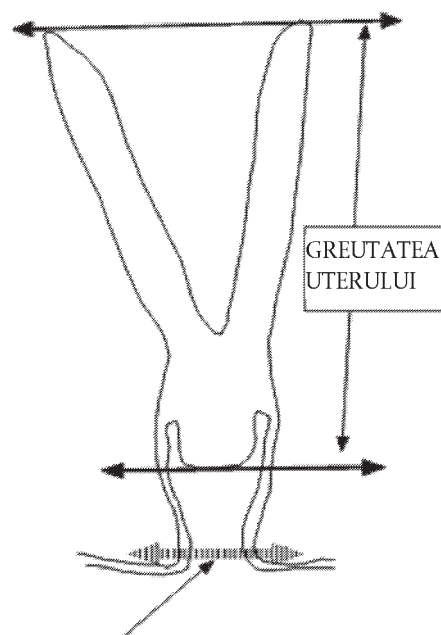


Procedura începe prin deschiderea peretelui dorso-lateral abdominal la mijlocul distanței dintre marginea inferioară costală și creasta iliacă și câțiva milimetri lateral de marginea laterală al mușchiului lombar. În cavitatea abdominală, se localizează ovarele. Ulterior, ovarele sunt îndepărtate fizic din cavitatea abdominală pe un câmp aseptice, se realizează o ligatură între ovare și uter pentru a controla sângerarea, iar ovarul este detașat prin incizie deasupra ligaturii la joncțiunea dintre oviduct și fiecare corn uterin. După ce se confirmă absența unei sângerări semnificative, peretele abdominal este închis prin suturi, iar pielea este închisă, de exemplu, prin autoclipsuri sau sutură. Trebuie să se permită ca animalele să își revină și greutatea uterului să regreseze timp de cel puțin 14 zile înainte de utilizare.

## ▼ M5

Figura 2

## Îndepărtarea și pregătirea țesuturilor uterine pentru măsurarea greutății



Linia de secționare la necropsie

Procedura începe prin deschiderea peretelui abdominal la simfiza pubiană. Ulterior, fiecare ovar, dacă sunt prezente, și cornul uterin sunt desprinse de peretele abdominal dorsal. Vezica urinară și ureterele sunt îndepărtate de pe partea ventrală și laterală a uterului și a vaginului. Adeziunea fibroasă dintre rect și vagin se desprinde până când se pot identifica joncțiunea orificiului vaginal și pielea perineală. Uterul și vaginul sunt desprinse din corp prin incizia peretelui vaginal chiar deasupra joncțiunii dintre pielea perineală, astfel cum se arată în figură. Uterul se desprinde de peretele corpului, prin tăierea cu grijă a mezenterului uterin la punctul de fixare a acestuia pe întreaga lungime a părții dorso-laterale a fiecărui corn uterin. După scoaterea din organism, se îndepărtează excesul de grăsime și țesutul conjunctiv. În cazul în care sunt prezente, ovarele se îndepărtează la nivelul oviductului, evitând pierderea de fluid luminal din cornul uterin. În cazul în care animalul a fost ovariectomizat, resturile sunt examinate pentru detectarea prezenței oricăror țesuturi ovariene. Se îndepărtează excesul de grăsime și de țesut conjunctiv. Vaginul este îndepărtat din uter chiar sub colul uterin, astfel încât colul uterin să rămână cu corpul uterin, astfel cum se arată în figură. Uterul poate fi apoi cântărit.

▼ **M5***Apendicele 1***DEFINIȚII**

**Antiestrogenicitate** înseamnă capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea estradiolului 17β într-un organism mamifer.

**Substanță chimică** înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

**Data fătării** este ziua 0 după fătare.

**Administrarea** este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării.

**Doză** înseamnă cantitatea de substanță testată administrată. Pentru biotestul uterotrofic, doza este exprimată ca greutate de substanță chimică pe unitatea de greutate corporală a animalului de laborator pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi).

**Doză maximă tolerată (DMT)** înseamnă cea mai mare cantitate de o substanță chimică care, atunci când este introdusă în organism, nu ucide animalele de laborator (notată cu DL<sub>0</sub>) (IUPAC, 1993).

**Estrogenicitate** înseamnă capacitatea unui produs chimic de a acționa în mod similar cu estradiolul 17β într-un organism mamifer.

**Ziua X după fătare** înseamnă ziua X de viață după ziua fătării.

**Sensibilitate** înseamnă proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active care sunt clasificate în mod corect prin intermediul testului. Aceasta este o măsurare a preciziei pentru o metodă de testare care produce rezultate categorice și este un element important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

**Specificitate** înseamnă proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive care sunt clasificate în mod corect prin intermediul testului. Aceasta este o măsurare a preciziei pentru o metodă de testare care produce rezultate categorice și este un element important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

**Substanță chimică de testat** înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testate utilizând prezenta metodă de testare.

**Uterotrofic** este un termen utilizat pentru a descrie o influență pozitivă asupra creșterii țesuturilor uterine.

**Validare** înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acestora pentru un anumit scop.



## Apendicele 2

**Notă:** Document elaborat de Secretariatul programului privind orientările referitoare la testare pe baza acordului încheiat în cadrul celei de-a 6-a reuniuni a grupului de lucru privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (EDTA)

## Cadrul conceptual OCDE privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>Nivelul 1</b><br>Sortarea și prioritizarea pe baza informațiilor existente  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Proprietățile fizice și chimice, ex. MW, reactivitate, volatilitate, biodegradabilitate</li> <li>— Expunerea umană și a mediului, ex. volumul de producție, eliberarea, modele de utilizare</li> <li>— Pericol, ex. datele toxicologice disponibile</li> </ul>  |  |
| <b>Nivelul 2</b><br>Teste <i>in vitro</i> care furnizează date mecanistice   | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Afinitatea de legare a receptorului ER, AR, TR</li> <li>— Activarea transcripțională</li> <li>— Aromataza și steroiogeneza <i>in vitro</i></li> <li>— Recunoașterea/legarea receptorului aril hidrocarbon</li> <li>— QSAR</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Teste preliminare cu debit sporit</li> <li>— Funcția tiroidiană</li> <li>— Test VGT de hepatocit la pești</li> <li>— Altele (după caz)</li> </ul> |
| <b>Nivelul 3</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre mecanisme și efecte endocrine unice                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Testul uterotrofic (asociat efectului estrogenic)</li> <li>— Testul Hershberger (asociat efectului androgenic)</li> <li>— Funcția hormonală mediată de nonreceptori</li> <li>— Altele (ex. tiroida)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Testul VGT (vitelogenin) la pești (asociat efectului estrogenic)</li> </ul>   |
| <b>Nivelul 4</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre mecanisme și efecte endocrine multiple                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>— OCDE407 îmbunătățit (parametri bazați pe mecanisme endocrine)</li> <li>— Test pe masculi și female aflate la pubertate</li> <li>— Test pe masculi intacți adulți</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Test de histopatologie a gonadelor la pești</li> <li>— Test privind metamorfoza broaștei</li> </ul>   |
| <b>Nivelul 5</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre efecte provocate de mecanisme endocrine și alte mecanisme | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Test pe 1 generație (TG415 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test pe 2 generații (TG416 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test de screening reproductiv (TG421 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test de screening combinat 28 de zile/reproducere (TG 422 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> </ul> <p><sup>1</sup> VMG mamm va avea în vedere potențiale îmbunătățiri</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Teste privind ciclul de viață parțial și complet la pești, păsări, amfibieni și nevertebrate (de dezvoltare și reproducere)</li> </ul>            |

VMG mamm: Grupul de gestionare privind validarea testelor și a evaluării la mamifere

**▼M5**

## NOTE LA CADRU:

- Nota 1:* Intrarea la toate nivelurile și ieșirea la toate nivelurile sunt posibile și depind de natura nevoilor de informații existente în scopul evaluării riscurilor și a pericolelor.
- Nota 2:* La nivelul 5, ecotoxicologia trebuie să includă parametri care să indice mecanisme de efecte adverse și eventuala vătămare a populației.
- Nota 3:* În cazul în care un model multimodal acoperă mai multe teste cu parametru unic, modelul respectiv ar înlocui utilizarea testelor cu parametru unic în cauză.
- Nota 4:* Evaluarea fiecărei substanțe chimice se efectuează de la caz la caz, ținând cont de toate informațiile disponibile, având în vedere funcția nivelurilor cadrului.
- Nota 5:* Nu trebuie să se considere că în prezent cadrul include toate testele. La nivelurile 3, 4 și 5, acesta include teste care sunt disponibile sau care sunt în curs de validare. Acestea din urmă sunt incluse cu titlu provizoriu. După dezvoltarea și validarea lor, acestea vor fi adăugate în mod oficial în cadru.
- Nota 6:* Nu trebuie să se considere că nivelul 5 include doar teste definitive. Se consideră că testele incluse la acest nivel contribuie la evaluarea generală a riscurilor și a pericolelor.

## ▼M5

## BIBLIOGRAFIE

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549.
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 $\beta$ -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerker K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.
- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369-373.

## ▼M5

- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320-333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33-41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288-305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284-291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

**▼M5**

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (12): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

## ▼ M5

**B.55. BIOTESTUL HERSHBERGER LA ȘOBOLANI: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI (ANTI)ANDROGENICE**

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 441 (2009). OCDE a inițiat în 1998 o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibilor perturbatori endocrini (1). Un element al activității a fost elaborarea de orientări privind testarea referitoare la biotestul Hershberger la șobolani. După mai multe decenii de utilizare de către industria farmaceutică, testul a fost standardizat de către un comitet oficial de experți în 1962 ca instrument de depistare a substanțelor chimice androgenice (2). În perioada 2001-2007, biotestul Hershberger la șobolani a fost supus unui amplu program de validare, inclusiv generarea unui document de revizuire a fondului (23), elaborarea unei lucrări detaliate privind metodele (3), dezvoltarea unui ghid de disecție (21) și desfășurarea de ample studii intra- și interlaboratoare pentru a demonstra fiabilitatea și reproductibilitatea biotestului. Studiile de validare au fost efectuate cu un androgen de referință puternic [propionat de testosteron (PT)], doi androgeni sintetici puternici (acetat de trenbolon și metil testosteron), un medicament antiandrogenic puternic (flutamida), un inhibitor puternic (finasterida) al sintezei androgenului natural (dihidrotesteron-DHT), mai multe pesticide slab antiandrogenice (linuron, vinclozolin, procimidon, p,p' DDE), un inhibitor puternic al 5α reductazei (finasterida) și două substanțe chimice negative cunoscute (dinitrofenol și nonilfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Prezenta metodă de testare este rezultatul îndelungatei experiențe istorice a biotestelor, precum și a experienței dobândite în timpul programului de validare a testului și a rezultatelor astfel obținute.
  
2. Biotestul Hershberger este un test de depistare *in vivo* pe termen scurt care utilizează țesuturi aferente tractului reproducător masculin. Testul își are originea în anii 1930 și a fost modificat în anii 1940 pentru a include mușchii sensibili la androgeni din tractul genital masculin (2) (9-15). În anii 1960, peste 700 de posibili androgeni au fost evaluați utilizând o versiune standardizată a protocolului (2) (14), iar utilizarea testului pentru androgeni și antiandrogeni a fost considerată o metodă standard în anii 1960 (2) (15). Biotestul actual se bazează pe modificările în greutate a cinci țesuturi dependente de androgeni la șobolanul mascul peripubertal castrat. Acesta evaluează capacitatea unei substanțe chimice de a provoca activități biologice în concordanță cu agoniștii sau antagoniștii de androgen sau inhibitorii de 5α-reductază. Cele cinci țesuturi țintă dependente de androgeni incluse în prezenta metodă de testare sunt prostata ventrală (PV), veziculele seminale (VS) (plus fluide și glande coagulante), mușchiul *levator ani bulbocavernosus* (LABC), glandele pereche Cowper (COW) și glandul penisului (GP). La șobolanul mascul peripubertal castrat, cele cinci țesuturi răspund toate la androgeni cu o creștere în greutate în termeni absoluți. În cazul în care aceleași țesuturi sunt stimulate să crească în greutate prin administrarea unui androgen de referință puternic, cele cinci țesuturi răspund la antiandrogeni cu o scădere în greutate în termeni absoluți. Principalul model pentru biotestul Hershberger a fost masculul peripubertal castrat prin metode chirurgicale, care a fost validat pentru fazele 1, 2 și 3 din programul de validare Hershberger.
  
3. Biotestul Hershberger servește ca un test mecanicist de depistare *in vivo* pentru detectarea de agoniști de androgeni, antagoniști de androgeni și inhibitori de 5α-reductază și aplicarea acestuia trebuie văzută în contextul „Cadrului conceptual al OCDE de testare și evaluare a perturbatorilor endocrini” (apendicele 2). Cadrul conceptual conține biotestul Hershberger la

## ▼ M5

nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la un singur mecanism endocrin, și anume, (anti)androgenicitatea. Acesta este destinat să fie inclus într-o baterie de teste *in vitro* și *in vivo* pentru a identifica substanțele chimice cu potențial de a interacționa cu sistemul endocrin, conducând în cele din urmă la evaluări de risc și de pericol pentru sănătatea umană sau pentru mediu.

4. Datorită preocupărilor pentru bunăstarea animalelor legate de procedura de castrare, s-a căutat masculul înțărcat stimulat (necastrat) ca model alternativ pentru biotestul Hershberger pentru a evita etapa castrării. Metoda de testare la animalele înțărcate stimulate a fost validată (24); cu toate acestea, în studiile de validare, versiunea cu animale înțărcate a biotestului Hershberger nu părea capabilă să detecteze în mod constant efectele asupra valorilor greutății organelor dependente de androgeni de antiandrogenii slabi la dozele testate. Prin urmare, aceasta nu a fost inclusă în metoda de testare. Cu toate acestea, recunoscând că utilizarea sa poate oferi nu numai beneficii legate de bunăstarea animalelor, ci, de asemenea, poate să furnizeze informații privind alte moduri de acțiune, aceasta este disponibilă în documentul de orientare al OCDE nr. 115 (25).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Agoniștii și antagoniștii de androgen acționează ca liganzi pentru receptorul de androgen și pot activa sau inhiba, respectiv, transcrierea genică controlată de receptor. În plus, unele substanțe chimice inhibă conversia testosteronului în androgenul natural mai puternic dihidrotestosteron în anumite țesuturi vizate de androgen (inhibitori de 5 $\alpha$ -reductază). Astfel de produse chimice au potențialul de a conduce la pericole pentru sănătate, inclusiv efecte asupra reproducerii și dezvoltării. Prin urmare, există necesitatea de reglementare pentru testarea și evaluarea rapidă a unui produs chimic ca un posibil agonist sau antagonist de androgen sau inhibitor de 5 $\alpha$ -reductază. Deși informativă, afinitatea unui ligand pentru un receptor de androgen, măsurată prin legarea receptorului sau activarea transcripției genelor reporter *in vitro*, nu este singurul factor determinant al unui posibil pericol. Alți factori determinanți includ activarea și dezactivarea metabolică la intrarea în corp, distribuția substanței chimice la țesuturile țintă și eliminarea din corp. Aceasta conduce la necesitatea de a depista posibila activitate a unei substanțe chimice *in vivo* în condiții și la o expunere relevante. Evaluarea *in vivo* este mai puțin critică în cazul în care sunt cunoscute caracteristicile substanței chimice referitoare la absorbție — distribuție — metabolism — eliminare (ADME). Țesuturile dependente de androgeni răspund cu o creștere rapidă și viguroasă la stimularea cu androgeni, în special la șobolanii masculi peripubertali castrați. Speciile de rozătoare, în special șobolanul, sunt utilizate, de asemenea, pe scară largă în studiile de toxicitate pentru caracterizarea riscurilor. Prin urmare, versiunea testului care utilizează șobolanul peripubertal castrat și cele cinci țesuturi țintă ale testului este adecvată pentru depistarea *in vivo* a agoniștilor și antagoniștilor de androgen și a inhibitorilor de 5 $\alpha$ -reductază.
6. Prezenta metodă de testare se bazează pe protocoalele utilizate în studiul de validare al OCDE, care s-au dovedit a fi fiabile și reproductibile în cadrul studiilor intra- și interlaboratoare (4) (5) (6) (7) (8). În cadrul metodei de testare sunt prezentate procedurile referitoare atât la androgeni, cât și la antiandrogeni.
7. Deși au existat unele variații în doza de PT utilizată pentru a detecta antiandrogenii în programul de validare al OCDE pentru biotestul Hershberger efectuat de laboratoare diferite (0,2 față de 0,4 mg/kg/zi, injectare subcutanată), există o foarte mică diferență între cele două variații ale protocolului în ceea ce privește capacitatea de a detecta activitate antiandrogenică slabă sau puternică. Cu toate acestea, este clar că doza de PT nu trebuie să fie prea ridicată pentru a bloca efectele antagoniștilor receptorilor de androgen (RA) slabi, dar nici atât de scăzută încât țesuturile androgenice să prezinte un răspuns de creștere foarte scăzut chiar și fără coadministrare de antiandrogeni.

## ▼ M5

8. Răspunsul de creștere al țesuturilor individuale dependente de androgeni nu este în totalitate de origine androgenică, însemnând că substanțe chimice altele decât agonisții de androgen pot modifica greutatea anumitor țesuturi. Cu toate acestea, răspunsul de creștere al mai multor țesuturi în mod concomitent fundamentează un mecanism cu un specific androgenic mai ridicat. De exemplu, doze mari de estrogeni puternici pot provoca o creștere a greutății veziculelor seminale; cu toate acestea, celelalte țesuturi dependente de androgeni din cadrul testului nu răspund în mod similar. Substanțele chimice antiandrogenice pot acționa fie ca antagoniști ai receptorilor de androgen, fie ca inhibitori de 5 $\alpha$ -reductază. Inhibitorii de 5 $\alpha$ -reductază au un efect variabil, întrucât conversia la dihidrotestosteronul mai puternic variază în funcție de țesut. Antiandrogenii care inhibă 5 $\alpha$ -reductaza, cum ar fi finasterida, au efecte mai pronunțate la nivelul prostatei ventrale decât la alte țesuturi, comparativ cu un antagonist RA puternic precum flutamida. Diferența la nivelul răspunsului țesutului poate fi utilizată pentru a diferenția între modurile de acțiune mediate de RA și cele mediate de 5 $\alpha$ -reductază. În plus, receptorul de androgen este înrudit din punct de vedere evolutiv cu cel al altor hormoni steroizi, iar alte tipuri de hormoni, atunci când sunt administrate la niveluri de dozare ridicate, supra-fiziologice, pot lega și antagoniza efectele de stimulare a creșterii ale PT (13). Mai mult, este plauzibil, de asemenea, că metabolismul steroid ridicat și o scădere ulterioară a nivelului de testosteron seric ar putea reduce creșterea țesutului dependent de androgeni. Prin urmare, orice rezultat pozitiv în cadrul biotestului Hershberger se evaluează în mod normal utilizând o abordare bazată pe forța probantă a dovezilor, inclusiv teste *in vitro*, cum ar fi testele de legare a RA și a receptorului de estrogen (RE) și testele de activare a transcripției genice corespunzătoare sau alte teste *in vivo* care examinează țesuturi similare vizate de androgeni, de exemplu, testul pe masculi puberali, testul pe masculi adulți intacti la 15 zile sau studii cu doze repetate la 28 de zile sau 90 de zile.
9. Experiența arată că androgenii xenobiotici sunt mai rari decât antiandrogenii xenobiotici. Prin urmare, se așteaptă ca biotestul Hershberger să fie utilizat cel mai adesea pentru depistarea antiandrogenilor. Cu toate acestea, procedura de testare pentru detectarea androgenilor ar putea să fie recomandată pentru substanțe steroide sau similare steroizilor sau substanțe pentru care o indicație de posibile efecte androgenice rezultă din metodele incluse la nivelul 1 sau 2 din cadrul conceptual (apendicele 2). În mod similar, efectele nocive asociate cu profile (anti)androgenice pot fi observate la testele de nivel 5, ceea ce a condus la necesitatea de a se evalua dacă o substanță chimică funcționează pe baza unui mod de acțiune asupra sistemului endocrin.
10. Este recunoscut faptul că toate procedurile bazate pe animale trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator; descrierile îngrijirii și ale tratamentului prezentate mai jos sunt standardele minime de performanță și sunt prevalente de reglementările locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (26). OCDE oferă orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor de laborator (17).
11. La fel precum în toate testele care utilizează animale de laborator, se analizează atent necesitatea efectuării studiului. În esență, pot exista două motive pentru o astfel de decizie:
  - potențial ridicat de expunere (nivelul 1 al cadrului conceptual) sau indicații de (anti)androgenicitate în testele *in vitro* (nivelul 2) care susțin necesitatea unor investigații pentru a verifica dacă astfel de efecte pot să apară *in vivo*;
  - efecte indicând (anti)androgenicitate în teste *in vivo* de la nivelul 4 sau 5 care susțin necesitatea unor investigații privind modul specific de acțiune, de exemplu, pentru a determina dacă efectele s-au datorat unui mecanism (anti)androgenic.



## ▼ M5

12. Definițiile utilizate în prezenta metodă de testare sunt prezentate în apendicele 1.

## PRINCIPIUL TESTULUI

13. Biotestul Hershberger își atinge sensibilitatea utilizând masculi cu o producție minimă de androgen endogen. Acest lucru se realizează prin utilizarea de masculi castrați, cărora li s-a acordat un timp adecvat după castrare pentru ca țesuturile țintă să regreseze la o greutate de referință minimă și uniformă. Astfel, atunci când se efectuează un test de depistare a potențialului de activitate androgenică, există niveluri scăzute de androgeni endogeni în circulație, axul hipotalamo-pituitar-gonadal este pus în imposibilitatea de a compensa prin mecanisme de feedback, capacitatea de răspuns a țesuturilor este maximizată și variabilitatea greutății de pornire a țesutului este redusă la minimum. În cazul în care se efectuează un test de depistare a unei potențiale activități antiandrogenice, se poate atinge o creștere mai consistentă a greutății țesutului atunci când țesuturile sunt stimulate de un androgen de referință. Ca urmare, biotestul Hershberger necesită doar 6 animale per grup de doză, în timp ce alte teste cu masculi puberali sau adulți intacti sugerează utilizarea a 15 masculi per grup de doză.
14. Castrarea șobolanilor masculi peripubertali se realizează în mod corespunzător utilizând o tehnică septică și anestezie aprobată. În primele zile în urma intervenției chirurgicale se administrează analgezice pentru a elimina disconfortul postchirurgical. Castrarea îmbunătățește precizia testării pentru detectarea androgenilor și a antiandrogenilor slabi prin eliminarea mecanismelor compensatorii de reacție ale sistemului endocrin prezente la animalele intacte care atenuează efectele androgenilor și ale antiandrogenilor administrați și prin eliminarea variabilității interindividuale ridicate la nivelul testosteronului seric. Prin urmare, castrarea reduce numărul de animale necesare pentru depistarea activităților respective la nivelul sistemului endocrin.
15. Atunci când se efectuează un test de depistare a activității androgenice, substanța de testat se administrează zilnic prin gavaj oral sau injectare subcutanată (SC) timp de zece zile consecutive. Substanțele chimice de testat se administrează la cel puțin două grupuri de animale de experiență, cu un singur nivel de doză per grup. Animalele sunt supuse autopsiei la aproximativ 24 de ore după ultima administrare. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic la două sau mai multe valori ale greutății organelor țintă pentru grupurile tratate cu substanța de testat comparativ cu grupul martor pentru vehicul indică faptul că substanța de testat este pozitivă pentru activitate androgenă potențială (a se vedea punctul 60). Androgenii, cum ar fi trenbolon, care nu pot fi reduși-5a, au efecte mai pronunțate asupra LABC și GP comparativ cu PT, dar toate țesuturile ar trebui să manifeste o creștere ridicată.
16. Atunci când se efectuează un test de depistare a potențialei activități antiandrogenice, substanța de testat se administrează zilnic prin gavaj oral sau injectare subcutanată timp de zece zile consecutive în mod concertat cu doze zilnice de PT (0,2 sau 0,4 mg/kg/zi) prin injectare SC. În programul de validare s-a stabilit că se poate utiliza o doză de 0,2 sau 0,4 mg/kg/zi de PT, întrucât ambele au fost eficiente în detectarea de antiandrogeni, în consecință, trebuie selectată doar o doză pentru a fi utilizată în testare. Doze gradate de substanță de testat se administrează la un minim de trei grupuri tratate de animale de experiență, utilizând un nivel de doză pe grup. Animalele sunt supuse autopsiei aproximativ la 24 de ore după ultima doză. O scădere semnificativă statistic la nivelul a două sau mai multe valori ale greutății organelor țintă pentru grupurile tratate cu substanța de testat plus PT comparativ cu grupul martor căruia i se administrează doar PT indică faptul că substanța de testat este pozitivă pentru o potențială activitate antiandrogenică (a se vedea punctul 61).

▼ **M5****DESCRIEREA METODEI****Selectarea speciei și sușei de animale**

17. Șobolanul a fost utilizat în mod obișnuit în biotestul Hershberger încă din anii 1930. Deși este plauzibil din punct de vedere biologic că atât șobolanul, cât și șoarecele vor manifesta răspunsuri similare, pe baza a 70 de ani de experiență cu modelul pe șobolani, șobolanul este specia preferată pentru biotestul Hershberger. În plus, din moment ce datele biotestului Hershberger pot fi preliminare pentru un studiu pe mai multe generații pe termen lung, acest lucru permite utilizarea de animale din aceeași specie, sușă și sursă în ambele studii.
18. Protocolul permite ca laboratoarele să selecteze sușa de șobolan care va fi utilizată și care trebuie, în general, să fie cea utilizată din punct de vedere istoric de laboratorul participant. Pot fi utilizate sușele de șobolan de laborator folosite în mod obișnuit; cu toate acestea, nu se utilizează sușele care se maturizează mult mai târziu de 42 de zile, deoarece castrarea masculilor la vârsta de 42 de zile poate exclude măsurarea valorilor greutateii glandului penisului, care poate fi efectuată doar după separarea prepuțului de trunchiul penisului. Astfel, nu se utilizează sușe derivate de la șobolanul Fisher 344, cu excepția unor cazuri rare. Șobolanul Fisher 344 are un calendar diferit al dezvoltării sexuale comparativ cu alte sușe utilizate mai frecvent, cum ar fi sușele Sprague Dawley sau Wistar (16). În cazul în care se va utiliza o astfel de sușă, laboratorul trebuie să castreze animalele la o vârstă puțin mai mare și să poată demonstra sensibilitatea sușei utilizate. Laboratorul trebuie să prezinte clar justificarea pentru alegerea sușei de șobolan. În cazul în care testul de depistare ar putea preceda un studiu cu doză orală repetată, un studiu privind reproducerea și dezvoltarea sau un studiu pe termen lung, se utilizează de preferință animale din aceeași sușă și sursă în toate studiile.

**Condiții de adăpostire și de hrănire**

19. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator. Descrierile îngrijirii și ale tratamentului sunt standarde minime și vor fi prevalente de reglementări locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (26). În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (cu un interval aproximativ,  $\pm 3$  °C). Se asigură o umiditate relativă cu valoarea minimă de 30 % și valoarea maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Obiectivul ar fi o umiditate relativă de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial. Alternanța zilnică a iluminatului trebuie să fie de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric.
20. Adăpostirea în grup este preferabilă izolării, din cauza vârstei tinere a animalelor și a faptului că șobolanii sunt animale sociale. Adăpostirea a două sau trei animale per cușcă evită aglomerarea și stresul asociat, care pot interfera cu controlul hormonal al dezvoltării țesutului aferent sexului. Cuștile trebuie să fie curățate cu grijă pentru a elimina eventualele contaminanți și aranjate astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. Cuștile de dimensiuni adecvate ( $\sim 2\,000\text{ cm}^2$ ) vor preveni supraaglomerarea.
21. Fiecare animal trebuie să fie identificat individual (de exemplu, prin marcarea sau etichetarea urechii) prin utilizarea unei metode fără suferință. Se consemnează metoda de identificare.

## ▼ M5

22. Hrana de laborator și apa potabilă se furnizează *ad libitum*. Laboratoarele care efectuează biotestul Hershberger trebuie să utilizeze hrană de laborator utilizată în mod normal în activitatea lor de testare a substanțelor chimice. În studiile de validare ale biotestului nu s-au observat efecte sau variabilitate care au fost atribuite hranei. Hrana utilizată va fi notată și un eșantion din hrana de laborator se păstrează în vederea unei eventuale analize ulterioare.

**Criterii de performanță pentru valorile greutateii organului dependent de androgeni**

23. În timpul studiului de validare, nu a existat nicio dovadă că o scădere a greutateii corporale a afectat creșterile și scăderile ratei de creștere a greutateii țesutului pentru țesuturile țintă (și anume, care trebuie cântărite în cadrul studiului).
24. Printre diferitele sușe de șobolan utilizate cu succes în programul de validare, valorile greutateii organelor dependente de androgeni sunt mai mari la sușele de șobolan cu greutate mai mare decât la sușele mai ușoare. Prin urmare, criteriile de performanță ale biotestului Hershberger nu includ valori absolute preconizate ale greutateii organelor pentru martori pozitivi și negativi.
25. Deoarece coeficientul de variație (CV) pentru un țesut are o relație inversă cu puterea statistică, criteriile de performanță ale biotestului Hershberger se bazează pe valorile maxime ale CV pentru fiecare țesut (tabelul 1). Valorile CV sunt derivate din studiile de validare ale OCDE. În cazul unor rezultate negative, laboratoarele trebuie să examineze CV de la grupul martor și grupul tratat cu doze ridicate pentru a determina dacă au fost depășite criteriile de performanță maxime ale CV.
26. Studiul se repetă atunci când: 1. trei sau mai multe din cele zece valori CV individuale posibile în grupurile martor și în grupurile tratate cu o doză ridicată depășesc limitele maxime desemnate pentru studiile referitoare la agonisti și antagonisti în tabelul 1; și 2. cel puțin două țesuturi țintă au fost marginal nesemnificative, și anume, cu valori  $r$  între 0,05 și 0,10.

Tabelul 1

**Valorile CV maxime admisibile stabilite pentru țesuturile sexuale anexe țintă pentru modelul cu animale castrate în studiile de validare ale OCDE <sup>(1)</sup>**

| Țesuturi          | Efecte antiandrogenice | Efecte androgenice |
|-------------------|------------------------|--------------------|
| Vezicule seminale | 40 %                   | 40 %               |
| Prostata ventrală | 40 %                   | 45 %               |
| LABC              | 20 %                   | 30 %               |
| Glandele Cowper   | 35 %                   | 55 %               |
| Glandul penisului | 17 %                   | 22 %               |

<sup>(1)</sup> A fost identificată valoarea prag a CV pentru un anumit țesut dintr-un grafic al valorilor CV — aranjate de la cel mai mic la cel mai mare din punct de vedere secvențial — pentru toate mediile obținute din toate experimentele din exercițiul de validare utilizând un model specific (agonist sau antagonist). S-a citit CV-ul prag de la punctul de la care creșterile intermediare până la cele mai ridicate valori ale CV din serie sunt dramatic mai mari decât cele câteva valori ale CV care precedă „punctul critic”. Trebuie menționat că, deși analiza a identificat „puncte critice” relativ fiabile pentru modelul antagonist al testului, curbele CV pentru testul de agonist au prezentat o creștere mai uniformă care a făcut ca identificarea unei valori prag a CV prin această metodă să fie oarecum arbitrară.

▼ **M5****PROCEDURĂ****Verificarea respectării dispozițiilor de reglementare și de laborator**

27. Spre deosebire de testul uterotrofic (capitolul B.54 din prezenta anexă), pentru testul Hershberger nu este necesară o demonstrație a competenței laboratorului înainte de începerea studiului, întrucât se efectuează teste martor concomitent pozitive (propionat de testosteron și flutamidă) și negative ca parte integrantă a testului.

**Numărul și starea animalelor**

28. Fiecare grup tratat și fiecare grup martor trebuie să includă cel puțin 6 de animale. Această măsură se aplică pentru protocoalele androgenice și anti-androgenice.

**Castrarea**

29. Trebuie să existe o perioadă de aclimatizare inițială de câteva zile de la primirea animalelor pentru a se asigura că animalele sunt sănătoase și viguroase. Deoarece este posibil ca animalele castrate înainte de vârsta de 42 de zile sau în ziua 42 după fătare (PND 42) să nu prezinte separare prepuțială, animalele se castrază la PND 42 sau ulterior, nu înainte. Animalele sunt castrate sub anestezie prin efectuarea unei incizii la nivelul scrotului și îndepărtarea ambelor testicule și a tuburilor testiculare cu ligaturarea vaselor de sânge și a conductelor seminale. După ce se confirmă că nu există sângerare, scrotul se închide cu sutură sau auto-clipsuri. Animalele se tratează cu analgezice în primele zile după intervenția chirurgicală pentru a atenua orice disconfort postchirurgical. În cazul în care animalele castrate sunt achiziționate de la un furnizor de animale, furnizorul garantează vârsta animalelor și stadiul de maturitate sexuală.

**Aclimatizarea după castrare**

30. Animalele continuă adaptarea la condițiile de laborator pentru a permite regresarea valorilor greutateii țesutului țintă timp de cel puțin 7 zile de la castrare. Animalele se observă zilnic și orice animale care manifestă semne de boală sau anomalii fizice sunt îndepărtate. Prin urmare, tratamentul cu începerea administrării (pe studiu) poate începe cel mai devreme la vârsta PND 49, dar nu mai târziu de PND 60. Vârsta la autopsie nu trebuie să depășească PND 70. Această flexibilitate permite unui laborator să programeze în mod eficient lucrările experimentale.

**Greutatea corporală și distribuirea aleatorie a grupurilor**

31. Diferențele la nivelul valorilor greutateii corporale individuale reprezintă o sursă de variabilitate la nivelul greutateii țesutului atât în cadrul unui grup, cât și între grupurile de animale. Variabilitatea tot mai ridicată a greutateii țesuturilor conduce la o creștere a coeficientului de variație (CV), reducând forța statistică a testului (numită uneori sensibilitatea testului). Prin urmare, variațiile la nivelul greutateii corporale trebuie să fie controlate din punct de vedere experimental și statistic.
32. Controlul experimental presupune producerea de mici variații ale greutateii corporale în interiorul unui grup și între grupurile de studiu. În primul rând, se evită animalele neobișnuit de mici sau de mari, acestea nefiind incluse în cohorta de studiu. La începerea studiului, variația de greutate a animalelor utilizate nu trebuie să depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie (de exemplu,  $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$  pentru șobolani peripubertali castrați). În al doilea rând, animalele se distribuie în grupuri (atât martor, cât și tratat) prin distribuție aleatorie a greutateii, astfel încât greutatea medie a fiecărui grup să nu fie statistic diferită de cea a oricărui alt grup. Se consimnează procedura de distribuție aleatorie în bloc.

## ▼M5

33. Deoarece toxicitatea poate diminua greutatea corporală la grupurile tratate în comparație cu grupul martor, se utilizează drept covariabilă statistică greutatea corporală în prima zi de administrare a substanței de testat, și nu greutatea corporală la autopsie.

**Dozare**

34. Pentru a stabili dacă o substanță chimică de test poate avea efect androgenic *in vivo*, două grupuri tratate cu substanța chimică plus grupuri martor pozitiv și martor pentru vehicul (negativ) (a se vedea punctul 43) sunt în mod normal suficiente, prin urmare, acest concept este preferat din motive de bunăstare a animalelor. În cazul în care scopul este de a obține o curbă doză-răspuns sau pentru a extrapola la doze mai mici, sunt necesare cel puțin 3 grupuri de tratament. În cazul în care sunt necesare mai multe informații în afară de identificarea activității androgenice (precum o estimare a potenței), ar trebui să fie luat în considerare un regim de administrare diferit. Pentru a studia activitatea antiandrogenilor, substanța de testat se administrează împreună cu un agonist androgen de referință. Se utilizează cel puțin 3 grupuri tratate cu diferite doze de substanță de testat, un martor pozitiv și un martor negativ (a se vedea punctul 44). Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate. Dacă se folosește un vehicul la administrarea substanței de testat, grupul martor trebuie să primească vehiculul în cantitatea cea mai mare utilizată la grupurile tratate.
35. Toate nivelurile de doză se propun și se selectează ținând cont de orice date existente privind toxicitatea și datele (toxico)cinetice disponibile pentru substanța de testat sau materialele asociate. Nivelul cel mai ridicat de doză trebuie, în primul rând, să țină seama de informațiile privind LD<sub>50</sub> și/sau toxicitatea acută pentru a evita decesul, suferințele grave sau stresarea animalelor (17) (18) (19) (20) și, în al doilea rând, să ia în considerare informațiile disponibile cu privire la dozele utilizate în studiile cronice și subcronice. În general, doza maximă nu ar trebui să determine o reducere în greutatea corporală finală a animalelor mai mare de 10 % din greutatea martor. Doza maximă ar trebui să fie 1. cea mai mare doză care să garanteze supraviețuirea animalelor și care nu provoacă animalelor toxicitate semnificativă sau suferință după 10 zile consecutive de administrare, până la o doză maximă de 1 000 mg/kg/zi (a se vedea punctul 36); sau 2. o doză care induce efecte (anti)androgenice, oricare dintre valori este mai mică. Ca partajare, sunt în general acceptabile intervale mari, de exemplu o semiunitate logaritmică (corespunzătoare unei progresii a dozei de 3,2) sau chiar până la o unitate logaritmică între doze. Dacă nu există informații relevante disponibile, se poate realiza un studiu preliminar pentru stabilirea dozelor (a se vedea punctul 37) pentru a contribui la stabilirea dozelor de utilizat.

**Nivelul dozei limită**

36. Dacă un test la doza limită de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi și o doză inferioară pe baza metodelor descrise pentru studiu nu produce o schimbare semnificativă din punct de vedere statistic la nivelul valorilor greutății organelor de reproducere, atunci se poate considera că nu sunt necesare niveluri de doze suplimentare. Doza limită se aplică cu excepția cazului în care datele referitoare la expunerea umană indică necesitatea unei doze mai ridicate.

**Considerații privind stabilirea nivelurilor dozelor**

37. În cazul în care este necesar, se poate efectua un studiu preliminar de stabilire a dozelor pe câteva animale, pentru a selecta nivelurile adecvate de doză [utilizând metode de testare pentru toxicitatea acută [capitolele B.1 bis, B.1 tris din prezenta anexă (27), OT nr. 425 ale OCDE (19)]. Obiectivul în cazul biotestului Hershberger este selectarea de doze care să garanteze supraviețuirea animalelor și care sunt fără toxicitate semnificativă sau suferință pentru animale după zece zile consecutive de administrare a

## ▼ M5

substanței chimice până la doza limită de 1 000 mg/kg/zi, astfel cum s-a specificat la punctele 35 și 36. În acest sens, se poate utiliza un document de orientare al OCDE (17) care definește semnele clinice care indică toxicitate sau suferința animalelor. În cazul în care este posibil în cadrul studiului de stabilire a dozelor, după zece zile de administrare, țesuturile țintă pot fi excizate și cântărite la aproximativ 24 de ore după administrarea ultimei doze. Datele pot fi utilizate ulterior pentru a contribui la selectarea dozelor în cadrul studiului principal.

#### Substanțele de referință și vehiculul

38. Agonistul androgen de referință este propionatul de testosteron (PT), CAS nr. 57-82-5. Doza de referință de PT poate fi fie 0,2 mg/kg greutate corporală/zi, fie 0,4 mg/kg greutate corporală/zi. Antagonistul androgen de referință este flutamida (FT), CAS nr. 1311-84-7. Doza de referință de FT este de 3 mg/kg greutate corporală/zi, iar FT se coadministrează cu doza PT de referință.
39. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase. Cu toate acestea, deoarece majoritatea liganzilor androgenului sau precursorii lor metabolici tind să fie hidrofobi, cea mai comună abordare este de a utiliza o soluție/suspensie în ulei (de exemplu, ulei de porumb, de arahide, de susan sau de măsline). Substanțele chimice de testat se pot dizolva într-o cantitate minimă de etanol 95 % sau alți solvenți adecvați și pot fi diluate la concentrații de lucru finale în vehiculul testat. Trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale solventului și se testează într-un grup martor separat numai cu solvent. În cazul în care substanța de testat este considerată stabilă, se poate utiliza o încălzire ușoară și acțiune mecanică viguroasă pentru a contribui la dizolvarea substanței de testat. Trebuie să se determine stabilitatea substanței de testat în vehicul. În cazul în care substanța de testat este stabilă pe durata studiului, se poate prepara o alicotă de pornire din substanța de testat, iar diluțiile de dozare specificate se prepară zilnic cu atenție pentru a evita contaminarea sau deteriorarea eșantioanelor.

#### Administrarea dozelor

40. PT se administrează prin injectare subcutanată, iar FT prin gavaj oral.
41. Substanța de testat se administrează prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. La alegerea căii de administrare, se ține seama de considerente legate de bunăstarea animalelor și de proprietățile fizice/chimice ale substanței de testat. În plus, trebuie luate în considerare aspecte toxicologice, precum relevanța pentru calea de expunere umană la substanța chimică (de exemplu, oral prin gavaj la modelul de ingerare, injectarea subcutanată la modelul de inhalare sau adsorbție cutanată), precum și informațiile toxicologice existente și datele cu privire la metabolism și cinetică (de exemplu, necesitatea de a evita primul pasaj metabolic, o mai bună eficiență prin utilizarea unei anumite căi) înainte de începerea unei testări extinse, pe termen lung, în cazul în care se obțin rezultate pozitive prin injectare.
42. Animalele trebuie tratate în același mod și în aceeași ordine timp de zece zile consecutive la intervale de aproximativ 24 ore. Nivelul de dozare se ajustează zilnic pe baza măsurărilor zilnice concomitente ale greutății corporale. Volumul dozei și momentul la care se administrează aceasta se notează în fiecare zi de expunere. Trebuie avut grijă să nu se depășească doza maximă specificată la punctul 35, pentru a permite o interpretare semnificativă a datelor. În acest sens, se analizează cu atenție reducerea greutății corporale, semnele clinice, precum și alte constatări. Pentru gavaj

▼ **M5**

oral, se utilizează un tub stomacal sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat odată depinde de dimensiunea animalului de laborator. Trebuie să se urmeze orientările locale privind îngrijirea animalelor, dar volumul nu trebuie să depășească 5 ml/kg masă corporală, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care se pot utiliza 10 ml/kg masă corporală. Pentru injectare subcutanată, dozele se administrează în regiunile dorso-scapulare sau lombare cu un ac steril (de exemplu, cu grosimea 23 sau 25) și o seringă tuberculină. Raderea zonei de injectare este opțională. Se notează eventualele pierderi, scurgeri la punctul de injectare sau administrarea incompletă. Volumul total injectat per șobolan pe zi nu trebuie să depășească 5 ml/kg greutate corporală.

**Proceduri specifice pentru agoniștii de androgen**

43. Pentru testul privind agoniștii de androgen, vehiculul este martorul negativ și grupul tratat cu PT este martorul pozitiv. Activitatea biologică în concordanță cu agoniștii de androgen este testată prin administrarea unei substanțe de testat la grupurile de tratament în dozele selectate timp de 10 de zile consecutive. Greutățile celor cinci țesuturi sexuale anexe de la grupurile tratate cu substanța de testat sunt comparate cu grupul martor pentru vehicul pentru creșteri în greutate semnificative din punct de vedere statistic.

**Proceduri specifice pentru antagoniștii de androgen și inhibitorii de 5 $\alpha$ -reductază**

44. Pentru testarea privind antagoniștii de androgen și inhibitori de 5 $\alpha$ -reductază, grupul tratat este martorul negativ și grupul coadministrat cu doze de referință de PT și FT este martorul pozitiv. Activitatea biologică în concordanță cu antagoniștii de androgen și inhibitori de 5 $\alpha$ -reductază este testată prin administrarea unei doze de referință de PT și administrarea substanței de testat timp de 10 zile consecutive. Valorile greutății celor cinci țesuturi sexuale anexe de la grupurile tratate cu substanța de testat plus PT se compară cu cele ale grupului de referință tratat doar cu PT pentru scăderi ale valorilor greutății semnificative din punct de vedere statistic.

**OBSERVAȚII****Observații clinice**

45. Se recomandă realizarea de observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și chiar mai frecvent în cazul în care se observă semne de toxicitate. Observațiile se efectuează, de preferință, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Toate animalele sunt observate pentru simptome de mortalitate, morbiditate și semne clinice generale, cum ar fi schimbări la nivelul comportamentului, al pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitate reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția pilosă, dimensiunea pupilei, respirație anormală).
46. Toate animalele găsite moarte se îndepărtează și se elimină fără o analiză suplimentară a datelor. Toate cazurile de mortalitate a animalelor înainte de autopsie se includ în notele studiului, împreună cu orice motive aparente pentru mortalitate. Toate animalele muribunde se eutanasează. Toate animale muribunde și, ulterior, eutanasiate sunt incluse în notele studiului, împreună cu motivele aparente pentru morbiditate.



▼ **M5****Greutatea corporală și consumul de hrană**

47. Toate animalele se cântăresc zilnic cu o precizie de 0,1 g, începând chiar înainte de inițierea tratamentului, și anume, atunci când animalele sunt distribuite în grupuri. Ca măsurare opțională, se poate cântări cantitatea de alimente consumate per cușcă în perioada tratamentului prin cântărirea alimentatoarelor. Rezultatele consumului alimentar se exprimă în grame pe șobolan pe zi.

**Disecția și măsurarea greutatei țesuturilor și a organelor**

48. La aproximativ 24 de ore după ultima administrare a substanței de testat, șobolanii se eutanasează și exsanguinează în conformitate cu procedurile normale ale laboratorului executant și se efectuează autopsia. Metoda de eutanasiere se notează în raportul de laborator.
49. În mod ideal, ordinea autopsiei va fi aleatorie între grupuri pentru a evita progresia directă în sus sau în jos în grupurile tratate care ar putea afecta datele. Orice constatare la autopsie, și anume, modificările patologice/leziunile macroscopice, se notează și se raportează.
50. Se cântăresc cele cinci țesuturi dependente de androgeni (PV, VS, LABC, COW, GP). Țesuturile respective sunt excizate, curățate cu grijă de excesul de țesut și grăsime aderent și se determină valorile greutății lor proaspete (nefixat). Fiecare țesut se manipulează cu atenție deosebită pentru a evita pierderea de fluide și pentru a evita deshidratarea, care poate determina erori semnificative și variabilitate prin descreșterea greutății consemnate. Mai multe dintre țesuturi ar putea fi foarte mici sau dificil de disecat, iar acest aspect va introduce variabilitate. Prin urmare, este important ca persoanele care efectuează disecția țesuturilor sexuale anexe să fie familiarizate cu procedurile de disecție standard pentru țesuturile respective. OCDE pune la dispoziție un manual de procedură standard de operare (PSO) pentru disecție (21). Formarea atentă în conformitate cu Ghidul PSO va reduce la minimum o sursă potențială de variație în studiu. În mod ideal, același operator ar trebui să fie responsabil cu disecția unui anumit țesut pentru a elimina diferențele interindividuale de prelucrare a țesutului. În cazul în care acest lucru nu este posibil, autopsia trebuie să fie concepută astfel încât fiecare operator să disece un anumit țesut de la toate grupurile de tratament, spre deosebire de situația în care un individ disecă toate țesuturile prelevate de la un grup martor, în timp ce o altă persoană este responsabilă cu grupurile tratate. Fiecare țesut aferent sexului se cântărește fără a fi tamponat cu o precizie de 0,1 mg și se consemnează greutatea pentru fiecare animal.
51. Mai multe dintre țesuturi ar putea fi foarte mici sau dificil de disecat, iar acest aspect va introduce variabilitate. Activitățile anterioare au indicat o serie de coeficienți de variație (CV), care par să difere în funcție de competența laboratorului. În câteva cazuri, s-au observat diferențe mari la nivelul valorilor absolute ale greutății unor țesuturi precum PV și COW în cadrul unui anumit laborator.
52. Valorile greutății ficatului, a rinichilor pereche și a glandelor suprarenale pereche sunt măsurători opționale. Din nou, țesuturile se curăță de orice urmă de fascia și grăsime. Se cântărește ficatul și se consemnează valoarea cu o precizie de 0,1 g, iar rinichii pereche și glandele suprarenale pereche se cântăresc și se consemnează valorile cu o precizie de 0,1 mg. Ficatul, rinichii și glandele suprarenale nu sunt influențate numai de androgeni; acestea oferă, de asemenea, indicii utile de toxicitate sistemică.



## ▼M5

53. Măsurarea hormonului luteinizant (HL) seric, stimularea hormonului de stimulare foliculară (HSF) și a testosteronului (T) este facultativă. Nivelurile de T seric sunt utile pentru a determina dacă substanța de testat induce metabolismul testosteron în ficat, reducând nivelurile de ser. Fără datele referitoare la T, un astfel de efect ar putea apărea prin intermediul unui mecanism antiandrogenic. Nivelurile de HL oferă informații despre capacitatea unui antiandrogen nu numai de a reduce greutatea organelor, ci și de a afecta funcția hipotalamo-pituitară, ceea ce, în cadrul studiilor pe termen lung, poate cauza tumori testiculare. HSF reprezintă un hormon important pentru spermatogeneză. Nivelurile de T4 și T3 serice sunt, de asemenea, măsurători opționale care ar furniza informații suplimentare cu privire la capacitatea de a perturba homeostaza hormonilor tiroidieni. În cazul în care trebuie să se facă măsurători ale hormonilor, șobolanii sunt anesteziați înainte de autopsie și sângele este prelevat prin puncție cardiacă, iar metoda de anestezie se alege cu grijă astfel încât să nu afecteze măsurarea hormonilor. Se consemnează metoda de pregătire a serului, sursa de radioimunodozare sau alte truse de măsurare, procedurile analitice și rezultatele. Nivelurile de HL se raportează în ng/ml de ser, iar nivelurile de T se raportează, de asemenea, în ng/ml de ser.

54. Disecția țesuturilor este descrisă după cum urmează, un ghid de disecție detaliat cu fotografii publicate ca materiale suplimentare făcând parte din programul de validare (21). O disecție video este, de asemenea, disponibilă pe pagina internet a Agenției Coreene pentru Alimente și Medicamente (Korea Food and Drug Administration) (22).

— Cu suprafața ventrală a animalului în sus, se determină dacă prepuțul penisului s-a separat de glandul penisului. În caz afirmativ, se efectuează retracția prepuțului și se îndepărtează glandul penisului, se cântărește (cu o precizie de 0,1 mg) și se notează greutatea.

— Se deschide pielea și peretele abdominal, expunând viscerele. În cazul în care organele opționale sunt cântărite, se îndepărtează și se cântărește ficatul cu o precizie de 0,1 g, se scot stomacul și intestinele, se scot și se cântăresc rinichii pereche și glandele suprarenale pereche cu o precizie de 0,1 mg. Această disecție expune vezica urinară și începe disecția țesuturilor sexuale anexe țintă.

— Pentru a diseca PV, se separă vezica de mușchiul ventral prin tăierea țesutului conjunctiv de-a lungul liniei mediane. Se deplasează vezica anterior spre veziculele seminale (VS), dezvăluind lobul stâng și lobul drept al prostatei ventrale (acoperiți de un strat de grăsime). Se desprinde cu grijă grăsimea de pe lobul drept și lobul stâng al PV. Se îndepărtează ușor lobul drept al VP de uretră și se taie lobul de la uretră. În timp ce lobul drept al PV se ține în continuare cu mâna, se îndepărtează ușor lobul stâng al PV de uretră și apoi se disecă; se cântărește cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.

— Pentru disecția VSGC, se deplasează vezica urinară caudal, expunând vasele deferente și lobii drept și stâng ai veziculelor seminale plus glande coagulante (VSGC). Se previn scurgerile de fluid prin prinderea unui hemostat la baza VSGC, în cazul în care vasele deferente se îmbină cu uretra. Se disecă cu atenție VSGC, cu hemostat aplicat, se îndepărtează grăsimea și organele anexe, se plasează într-un vas tarat de cântărit, se îndepărtează hemostatul și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg, notându-se greutatea.

▼ **M5**

- Pentru disecția mușchilor *levatori ani plus bulbocavernosus* (LABC), se expun mușchii și baza penisului. Mușchii LA sunt înfășurați în jurul colonului, în timp ce mușchii LA și BC anteriori sunt atașați la bulbii penisului. Se îndepărtează pielea și organele anexe din regiunea perianală care se întind de la baza penisului până la capătul anterior al anusului. Mușchii BC se îndepărtează treptat de bulbul penisului și țesuturi. Colonul este tăiat în două și întregul LABC poate fi disecat și îndepărtat. LABC se curăță de grăsime și de anexe, se cântărește cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.
  - După ce s-a îndepărtat LABC, glandele rotunde Cowper sau glandele bulbo-uretrale (COW) sunt vizibile la baza bulbilor penisului și ușor dorsal față de aceștia. Este necesară o disecție atentă pentru a evita creșterea capsulei subțiri, pentru a preveni scurgerea de fluid. Se cântăresc COW pereche cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.
  - În plus, în cazul în care se pierde fluid din oricare glandă în timpul autopsiei și disecției, aceasta trebuie să fie consemnată.
55. În cazul în care evaluarea fiecărei substanțe chimice necesită autopsia mai multor animale decât este rezonabil pentru o singură zi, începutul studiului poate fi eșalonat pe două zile consecutive, ceea ce conduce la eșalonarea autopsiei și a activităților asociate pe parcursul a două zile. În cazul unei astfel de eșalonări, se utilizează o jumătate din animale per grup de tratament pe zi.
56. Carcasele se elimină în mod corespunzător după autopsie.

**RAPORT****Date**

57. Datele se raportează individual (și anume, greutatea corporală, greutatea țesuturilor sexuale anexe, măsurători opționale și alte răspunsuri și observații) și pentru fiecare grup de animale (media și deviația standard ale tuturor măsurătorilor efectuate). Acestea se sistematizează în tabele. Datele indică numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte pe parcursul testului sau care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, incluzând momentul apariției, durata și severitatea.
58. Un raport final va include:

*Unitatea de testare*

- denumirea unității, localizarea;
- directorul studiului și alți membri ai personalului și responsabilitățile acestora în cadrul studiului;
- datele de început și de sfârșit ale studiului, și anume, prima zi de administrare a substanței chimice de testat și, respectiv, ultima zi a autopsiei.

*Substanța chimică de testat*

- sursa, numărul lotului, identitatea, puritatea, adresa completă a furnizorului și caracterizarea substanței/substanțelor de testat;
- natura fizică și, acolo unde este cazul, proprietățile fizico-chimice;
- condițiile de depozitare și metoda și frecvența pregătirii diluției;
- toate datele obținute cu privire la stabilitate;
- orice analize ale soluțiilor/suspensiilor de dozare.

**▼ M5***Vehicul*

- caracterizarea vehiculului (identitate, furnizor și nr. lot);
- justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

*Animale de laborator și proceduri de creștere a animalelor*

- specia și sușa și justificarea alegerii acestora;
- sursa sau furnizorul de animale, inclusiv adresa completă;
- numărul și vârsta animalelor livrate;
- condițiile de adăpostire (temperatură, iluminat etc.);
- hrana (denumirea, tipul, furnizorul, numărul lotului, conținutul și, dacă se cunosc, nivelurile de fitoestrogen);
- așternut (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul);
- condițiile de plasare în cuști și numărul de animale per cușcă.

*Condiții de testare*

- vârsta la castrare și durata aclimatizării după castrare;
- greutatea fiecărui animal la începutul studiului (cu o precizie de 0,1 g);
- procesul de selecție aleatorie, precum și consemnarea alocării în grupul pentru vehicul, grupul de referință, grupul tratat cu substanța de testat și pe cuști;
- media și deviația standard a valorilor greutății corporale pentru fiecare grup pentru fiecare zi de cântărire pe tot parcursul studiului;
- justificarea alegerii dozei;
- calea de administrare a substanței de testat și justificarea alegerii căii de expunere;
- în cazul unui test de antiandrogenicitate, tratamentul PT (doză și de volum);
- administrarea substanței chimice de testat (doză și volum);
- momentul administrării;
- proceduri de autopsie, inclusiv mijloacele de exsanguinare și orice fel de anestezie;
- în cazul în care se efectuează analize ale serului, se furnizează detalii ale metodei. De exemplu, în cazul în care se utilizează RIA, se raportează procedura RIA, sursa de truse RIA, datele de expirare ale truselor, procedura pentru numărătoarea scintilației și standardizarea.

*Rezultate*

- observații zilnice pentru fiecare animal în timpul tratamentului, inclusiv:
- greutatea corporale (cu o precizie de 0,1 g);
- semnele clinice (în cazul în care există);
- orice măsurătoare sau note privind consumul alimentar;
- observațiile la autopsie pentru fiecare animal, inclusiv:

**▼ M5**

- data autopsiei;
- grupul animalelor tratate;
- identitatea animalelor;
- operatorul;
- momentul din zi la care s-au efectuat autopsia și disecția;
- vârsta animalelor;
- greutatea corporală finală la autopsie, notând orice creștere sau scădere semnificativă din punct de vedere statistic;
- ordinea exsanguinării și disecției animalelor în momentul autopsiei;
- valorile greutății celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni:
- prostata ventrală (cu o precizie de 0,1 mg);
- veziculele seminale plus glandele coagulante, inclusiv fluidul (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);
- mușchiul complex *levator ani plus bulbocavernosus* (cu o precizie de 0,1 mg);
- glandele Cowper (greutatea în stare proaspătă — pereche, cu o precizie de 0,1 mg);
- glandul penisului (greutatea în stare proaspătă cu o precizie de 0,1 mg);
- valorile greutății țesuturilor opționale, în cazul în care sunt determinate:
- ficat (cu o precizie de 0,1 mg);
- rinichi (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);
- glande suprarenale (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);
- observații generale și observații;
- analize ale hormonilor serici, dacă se efectuează astfel de teste:
  - HL seric (opțional — ng/ml de ser); și
  - T seric (opțional — ng/ml de ser);
- observații generale și comentarii.

**Rezumatul datelor**

Datele se sistematizează în tabele care conțin dimensiunea eșantionului pentru fiecare grup, valoarea medie și eroarea standard a mediei sau deviația standard. Tabelele includ greutatea corporală la autopsie, variații ale greutății corporale de la începutul testului până la autopsie, greutățile țesuturilor sexuale anexe țintă, precum și orice greutăți ale organelor analizate opțional.

**Discutarea rezultatelor****Analiza rezultatelor**

59. Valorile greutății corporale și a organelor la autopsie se analizează din punct de vedere statistic pentru caracteristici precum omogenitatea varianței, cu transformări de date corespunzătoare, după caz. Grupurile de tratament se compară cu un grup martor, utilizând tehnici precum ANOVA, urmată de comparații pe perechi (de exemplu, testul unilateral Dunnett) și criteriul de diferență statistică, de exemplu,  $p \leq 0,05$ . Se identifică grupurile care ating semnificație statistică. Cu toate acestea, se evită stabilirea greutăților „relative ale organelor” din cauza ipotezelor statistice incorecte care stau la baza unei astfel de manipulări a datelor.

## ▼ M5

60. Pentru agonismul androgen, martorul ar trebui să fie grupul tratat doar cu vehicul. Caracteristicile referitoare la modul de acțiune al unei substanțe chimice de testat pot conduce la răspunsuri relative diferite între țesuturi, de exemplu, trenbolon, care nu poate fi redus 5 alfa, are efecte mai pronunțate asupra LABC și GP decât PT. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic ( $p \leq 0,05$ ) la nivelul a două sau mai multe din greutatea celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni (PV, LABC, GP, GC și VSGC) se consideră ca fiind un rezultat agonist androgen pozitiv și toate țesuturile țintă ar trebui să manifeste un anumit grad de creștere a dezvoltării. Evaluarea combinată a tuturor răspunsurilor țesuturilor organelor sexuale anexe (OSA) se poate realiza prin analiza adecvată a datelor multivariate. Acest lucru ar putea îmbunătăți analiza, în special în cazurile în care doar un singur țesut oferă un răspuns semnificativ statistic.
61. Pentru antagonismul androgen, martorul ar trebui să fie grupul tratat cu androgenul de referință (numai propionat de testosteron). Caracteristicile referitoare la modul de acțiune al unei substanțe chimice de testat pot conduce la răspunsuri relative diferite între țesuturi, de exemplu, inhibitorii de 5 $\alpha$ -reductază, cum ar fi finasterida, au efecte mai pronunțate asupra prostatei ventrale decât asupra altor țesuturi în comparație cu antagoniști puternici RA precum flutamida. O reducere semnificativă din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) la nivelul a două sau mai multe dintre greutatea celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni (PV, LABC, GP, GC și VSGC) asociată tratamentului numai cu PT se consideră un rezultat pozitiv al antagonistului de androgen și toate țesuturile țintă ar trebui să manifeste un anumit grad de reducere a dezvoltării. Evaluarea combinată a tuturor răspunsurilor țesuturilor OSA se poate realiza prin analiza adecvată a datelor multivariate. Acest lucru ar putea îmbunătăți analiza, în special în cazurile în care doar un singur țesut oferă un răspuns semnificativ statistic.
62. Datele se sistematizează în tabele care conțin valoarea medie, eroarea standard a mediei (deviația standard ar fi, de asemenea, acceptabilă) și dimensiunea eșantionului pentru fiecare grup. Se includ, de asemenea, tabele cu date individuale. Se analizează valorile individuale, valorile medii, SE (SD) și CV pentru datele martor pentru a stabili dacă acestea îndeplinesc criterii acceptabile de consecvență cu valorile istorice preconizate. Valorile CV care depășesc valorile CV enumerate în tabelul 1 (a se vedea punctele 25 și 26) pentru greutatea fiecărui organ determină dacă există erori legate de înregistrarea sau introducerea datelor sau dacă laboratorul nu a dobândit încă expertiza pentru disecția țesuturilor dependente de androgeni și se impun cursuri de specializare/practică suplimentare. În general, valorile CV (deviația standard împărțită la greutatea medie a organelor) sunt reproductibile de la un laborator la altul și de la studiu la altul. Datele prezentate vor include cel puțin: greutatea pentru prostata ventrală, veziculele seminale, mușchiul *levator ani plus bulbocavernosus*, glandele Cowper, glandul penisului, ficatul și greutatea corporală, precum și modificarea greutății corporale de la începutul testului până la autopsie. De asemenea, datele pot fi prezentate după ajustarea covarianței pentru greutate corporală, dar aceasta nu înlocuiește prezentarea datelor neajustate. În plus, în cazul în care separarea prepuțială (SPP) nu apare în niciun grup, se consemnează incidența SPP și se compară din punct de vedere statistic cu grupul martor care utilizează testul Fisher Exact.

**▼ M5**

63. Atunci când se verifică intrările de date electronice cu fișele de date originale pentru precizie, valorile greutății organelor care nu sunt plauzibile biologic sau variază cu mai mult de trei abateri standard de la mediile grupului de tratament se examinează cu atenție și ar putea fi necesar să fie eliminate, fiind probabil erori de înregistrare.
64. Compararea rezultatelor studiului cu valorile CV ale OCDE (în tabelul 1) reprezintă adesea un pas important în interpretare, în ceea ce privește valabilitatea rezultatelor studiului. Datele istorice pentru grupurile martor se păstrează în laborator. Datele istorice pentru răspunsurile la substanțele de referință pozitive, cum ar fi PT și FT, se păstrează, de asemenea, în laborator. De asemenea, laboratoarele pot să testeze periodic reacția la agonști și antagonști androgenici slabi cunoscuți și să păstreze datele. Datele respective pot fi comparate cu datele OCDE disponibile pentru a se asigura că metodele laboratorului furnizează suficientă precizie și putere statistică.

▼ **M5***Apendicele 1*

## DEFINIȚII

**Androgenic** este un termen utilizat pentru a descrie o influență pozitivă asupra creșterii țesuturilor dependente de androgeni.

**Antiandrogenic** înseamnă capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea PT într-un organism de mamifer.

**Substanță chimică** înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

**Data fătării** este ziua 0 după fătare.

**Doză** înseamnă cantitatea de substanță testată administrată. Pentru biotestul Hershberger, doza este exprimată ca greutate de substanță chimică pe unitatea de greutate corporală a animalului de laborator pe zi (de exemplu mg/kg greutate corporală/zi).

**Administrarea** este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării.

**Muribund** este un termen utilizat pentru a descrie un animal pe moarte, adică aproape de deces.

**Ziua X după fătare** este ziua X de viață după ziua fătării.

**Sensibilitate** înseamnă capacitatea unei metode de testare de a identifica în mod corect substanțele chimice care au proprietatea pentru care se testează.

**Specificitate** înseamnă capacitatea unei metode de testare de a identifica în mod corect substanțele chimice care nu au proprietatea pentru care se testează.

**Substanță chimică de testat** înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

**Validare** înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acestora pentru un anumit scop.

## Apendicele 2

**Notă:** Document elaborat de Secretariatul programului privind orientările referitoare la testare pe baza acordului încheiat în cadrul celei de-a 6-a reuniuni a grupului de lucru privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (EDTA)

## Cadrul conceptual OCDE privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini

|  |  |
|--|--|
| <b>Nivelul 1</b><br>Sortarea și prioritizarea pe baza informațiilor existente  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Proprietățile fizice și chimice, ex. MW, reactivitate, volatilitate, biodegradabilitate</li> <li>— Expunerea umană și a mediului, ex. volumul de producție, eliberarea, modele de utilizare</li> <li>— Pericol, ex. datele toxicologice disponibile</li> </ul>  |
| <b>Nivelul 2</b><br>Teste <i>in vitro</i> care furnizează date mecanistice   | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Afinitatea de legare a receptorului ER, AR, TR</li> <li>— Activarea transcripțională</li> <li>— Aromataza și steroiogeneza <i>in vitro</i></li> <li>— Recunoașterea/legarea receptorului anil hidrocarbon</li> <li>— QSAR</li> <li>— Teste preliminare cu debit sporit</li> <li>— Funcția tiroidiană</li> <li>— Test VGT de hepatocit la pești</li> <li>— Altele (după caz)</li> </ul>  |
| <b>Nivelul 3</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre mecanisme și efecte endocrine unice                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Testul uterotrofic (asociat efectului estrogenic)</li> <li>— Testul Hershberger (asociat efectului androgenic)</li> <li>— Funcția hormonală mediată de nonreceptori</li> <li>— Altele (ex. tiroida)</li> <li>— Testul VGT (vitelogenin) la pești (asociat efectului estrogenic)</li> </ul>  |
| <b>Nivelul 4</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre mecanisme și efecte endocrine multiple                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>— OCDE407 îmbunătățit (parametri bazați pe mecanisme endocrine)</li> <li>— Test pe masculi și female aflate la pubertate</li> <li>— Test pe masculi intacti adulți</li> <li>— Test de histopatologie a gonadelor la pești</li> <li>— Test privind metamorfoza broaștei</li> </ul>   |
| <b>Nivelul 5</b><br>Teste <i>in vivo</i> care furnizează date despre efecte provocate de mecanisme endocrine și alte mecanisme | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Test pe 1 generație (TG415 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test pe 2 generații (TG416 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test de screening reproductiv (TG421 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Test de screening combinat 28 de zile/reproducere (TG 422 îmbunătățit)<sup>1</sup></li> <li>— Teste privind ciclul de viață parțial și complet la pești, păsări, amfibieni și nevertebrate (de dezvoltare și reproducere)</li> </ul> |

<sup>1</sup> VMG mamm va avea în vedere potențiale îmbunătățiri

VMG mamm: Grupul de gestionare privind validarea testelor și a evaluării la mamifere



**▼M5****NOTE LA CADRU**

- Nota 1:* Intrarea la toate nivelurile și ieșirea la toate nivelurile sunt posibile și depind de natura necesităților de informații existente în scopul evaluării riscurilor și a pericolelor.
- Nota 2:* La nivelul 5, ecotoxicologia trebuie să includă parametri care să indice mecanisme de efecte adverse și eventuala vătămare a populației.
- Nota 3:* În cazul în care un model multimodal acoperă mai multe teste cu parametru unic, modelul respectiv ar înlocui utilizarea testelor cu parametru unic în cauză.
- Nota 4:* Evaluarea fiecărei substanțe chimice se efectuează de la caz la caz, ținând cont de toate informațiile disponibile, având în vedere funcția nivelurilor cadrului.
- Nota 5:* Nu trebuie să se considere că în prezent cadrul include toate testele. La nivelurile 3, 4 și 5 acesta include teste care sunt disponibile sau care sunt în curs de validare. Acestea din urmă sunt incluse cu titlu provizoriu. După dezvoltarea și validarea lor, acestea vor fi adăugate în mod oficial în cadru.
- Nota 6:* Nu trebuie să se considere că nivelul 5 include doar teste definitive. Se consideră că testele incluse la acest nivel contribuie la evaluarea generală a riscurilor și a pericolelor.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼ **M5**

- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J* 26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19nor-testosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.
- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: *Methods in Hormone Research*, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology*, volume I. New York: Humana Press, p. 38.
- (17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 926412367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: Disponibil la: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. Disponibil la: [http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education\\_fr.html](http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html)
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

**▼M5**

- (26) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (27) Următoarele capitole din prezenta anexă:
  - B.1 bis, Toxicitate orală acută — procedura cu doză fixă
  - B.1 tris, Toxicitate orală acută — metoda clasei toxice acute.

▼ **M5****B.56. STUDIU EXTINS DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE O GENERAȚIE****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 443 (2012). Metoda se bazează pe propunerea comitetului tehnic International Life Science Institute (ILSI) — Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) privind un studiu extins de reproducere efectuat pe o generație în etapa de viață  $F_1$ , publicată în Cooper et al., 2006 (1). S-au realizat mai multe îmbunătățiri și clarificări ale conceptului studiului pentru a-i oferi flexibilitate și pentru a sublinia importanța de a porni de la cunoștințele existente, utilizând în același timp observații în-viață pentru a ghida și a adapta testarea. Prezenta metodă de testare oferă o descriere detaliată a desfășurării operaționale a unui studiu extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. Metoda de testare descrie trei cohorte de animale  $F_1$ :

*cohorta 1:* evaluează parametrii de reproducere/dezvoltare; cohorta se poate extinde pentru a include o generație  $F_2$ ;

*cohorta 2:* evaluează impactul potențial al expunerii la substanțe chimice asupra sistemului nervos în curs de dezvoltare;

*cohorta 3:* evaluează impactul potențial al expunerii la substanțe chimice asupra sistemului imunitar în curs de dezvoltare.

2. Deciziile referitoare la evaluarea celei de a doua generații și la omiterea cohorței privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare și/sau a cohorței privind imunotoxicitatea pentru dezvoltare trebuie să reflecte cunoștințele existente referitoare la substanța chimică evaluată, precum și nevoile specifice ale diferitelor autorități de reglementare. Scopul metodei de testare este de a furniza detalii cu privire la modul în care se poate efectua studiul și de a aborda modul în care trebuie să fie evaluată fiecare cohortă.
3. Procedura privind decizia de declanșare internă pentru producerea unei a doua generații este descrisă în documentul de orientare al OCDE nr. 117 (39) pentru autoritățile de reglementare care utilizează declanșatori interni.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI OBIECTIVE**

4. Obiectivul principal al studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație este de a evalua anumite etape ale ciclului de viață care nu sunt incluse în alte tipuri de studii de toxicitate și de a analiza efectele care pot apărea ca urmare a expunerii pre- și postnatale la o substanță chimică. Pentru obiective de reproducere, se are în vedere faptul că, atunci când sunt disponibile și ca un prim pas, informațiile din studii cu doze repetate [inclusiv studii de depistare a toxicității pentru reproducere, de exemplu OT nr. 422 ale OCDE (32)] sau teste pe termen scurt de depistare a perturbatorilor endocrini [de exemplu, testul uterotrofic — metoda de testare B.54 (36); și testul Hershberger — metoda de testare B.55 (37)] sunt utilizate pentru a detecta efectele asupra organelor de reproducere la masculi și femele. Acestea ar putea include spermatogeneza (histopatologie testiculară) pentru masculi, precum și ciclurile estrale, numărarea foliculilor/maturizarea ovocitelor și integritatea ovariană (histopatologie) pentru femele. Studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație servește, în acest caz, ca un test pentru obiective de reproducere care necesită interacțiunea masculilor cu femele, femele gestante, precum și femele cu pui și generația  $F_1$  până la maturizarea sexuală [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE care sprijină prezenta metodă de testare (40)].

## ▼ M5

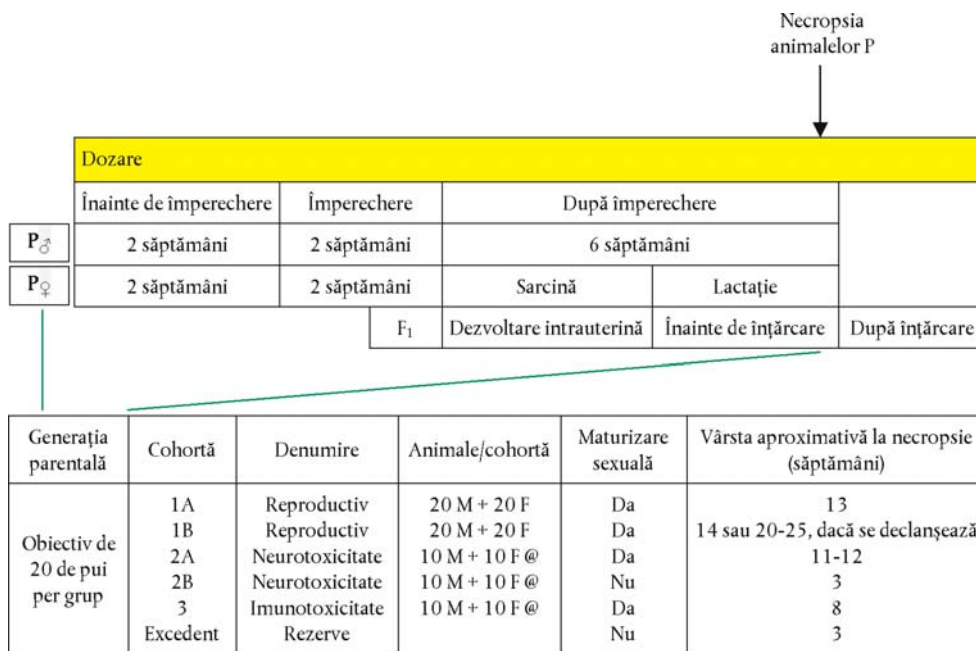
5. Metoda de testare este concepută să furnizeze o evaluare a efectelor pre- și postnatale ale substanțelor chimice asupra dezvoltării, precum și o evaluare aprofundată a toxicității sistemice la femelele gestante și femelele în lactație și la puii tineri și adulți. Se preconizează că examinarea detaliată a principalilor parametri pentru dezvoltare, cum ar fi viabilitatea puilor, sănătatea neonatală, statutul de dezvoltare la naștere, dezvoltarea fizică și funcțională până la vârsta adultă, va identifica organe țintă specifice la pui. În plus, studiul va oferi și/sau confirma informațiile cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin la adulți. În mod special, dar nu exclusiv, se analizează parametrii următori: funcția gonadică, ciclul estral, maturarea spermei epididimale, comportamentul de împerechere, concepția, sarcina, nașterea și alăptarea. În plus, informațiile obținute din evaluările privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare și din evaluările privind imunotoxicitatea pentru dezvoltare vor caracteriza efectele potențiale asupra sistemelor respective. Datele rezultate din teste vor permite determinarea dozei la care nu s-a observat nicio reacție adversă (No-Observed Adverse Effect Levels, NOAEL), nivelul cel mai scăzut pentru care este observat un efect advers (Lowest Observed Adverse Effect Levels, LOAEL) și/sau dozele de referință pentru diferiți parametri și/sau utilizate pentru caracterizarea efectelor constatate în studii anterioare cu doze repetate și/sau ca ghid pentru testări ulterioare.
  
6. O schemă a protocolului este prezentată în figura 1. Substanța de testat se administrează în mod continuu, în doze crescătoare, mai multor grupuri de femele și masculi maturi din punct de vedere sexual. Generația parentală (P) este tratată pentru o perioadă de timp definită înainte de împerechere (selectată pe baza informațiilor disponibile pentru substanța de testat, dar timp de cel puțin două săptămâni) și o perioadă de două săptămâni de împerechere. Masculii P sunt tratați în continuare cel puțin până la înțărirea F<sub>1</sub>. Aceștia ar trebui tratați timp de cel puțin 10 săptămâni. Masculii pot fi tratați o perioadă mai lungă de timp dacă este necesar să se clarifice efectele asupra reproducerii. Tratamentul femelelor P este continuat în timpul sarcinii și al alăptării până la sacrificare după înțărirea puilor lor (și anume, 8-10 săptămâni de tratament). Puii F<sub>1</sub> sunt tratați în continuare cu substanța de testat de la înțarcare până la vârsta adultă. Dacă este evaluată o a doua generație [a se vedea documentul de orientare nr. 117 al OCDE (39)], puii F<sub>1</sub> sunt menținuți sub tratament până la înțărirea F<sub>2</sub> sau până la sacrificare.
  
7. Se efectuează observații clinice și examinări patologice asupra tuturor animalelor în vederea notării simptomelor de toxicitate, cu un accent special asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin și asupra sănătății, creșterii, dezvoltării și funcționării puilor. După înțarcare, puii selectați se distribuie în cohorte specifice (cohortele 1-3, a se vedea punctele 33 și 34 și figura 1) pentru mai multe investigații, inclusiv maturizarea sexuală, integritatea și funcția organelor de reproducere, parametrii neurologici și comportamentali și funcțiile imunitare.
  
8. În desfășurarea studiului, se respectă principiile directe și considerentele descrise în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca parametri fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (34).

## ▼ M5

9. Atunci când va fi disponibil un număr suficient de studii pentru a determina impactul noului concept de studiu, metoda de testare va fi examinată și, în cazul în care este necesar, revizuită, având în vedere experiența acumulată.

Figura 1

## Schemă a studiului extins de toxicitate asupra reproducerii pe o generație



@ unul per cuib și reprezentativ pentru 20 de cuiburi în total, dacă este posibil

## DESCRIEREA METODEI/PREPARATE PENTRU TEST

## Animale

## Selectarea speciei și sușei de animale

10. Alegerea speciei pentru testul de toxicitate pentru reproducere se analizează cu atenție, ținând seama de toate informațiile disponibile. Cu toate acestea, din cauza amplitudinii informațiilor contextuale și a comparabilității testelor de toxicitate generală, în mod normal, specia preferată este șobolanul, iar criteriile și recomandările formulate în prezenta metodă de testare se referă la această specie. Dacă se utilizează altă specie, se va oferi o justificare și trebuie să se efectueze modificări corespunzătoare ale protocolului. Nu se utilizează sușe cu fertilitate scăzută sau cu o incidență ridicată bine-cunoscută a defectelor spontane de dezvoltare.

## Vârsta, greutatea corporală și criteriile de includere

11. Se utilizează animale parentale sănătoase, care nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Se studiază atât masculii, cât și femelele, iar femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Animalele P trebuie să fie la maturitate sexuală, de aceeași greutate (în cadrul aceluiași sex) la începerea administrării, de vârstă similară (aproximativ 90 de zile) la împerechere și reprezentative pentru specia și sușa studiată. Animalele se aclimatizează timp de cel puțin 5 zile de la sosire. Animalele sunt atribuite în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament, într-un mod care conduce la valori medii comparabile ale greutății corporale între grupuri (și anume,  $\pm 20\%$  din valoarea medie).

## ▼ M5

*Condiții de adăpostire și de hrănire*

12. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm 3$  °C). Se asigură o umiditate relativă între 30-70 %, cu un interval ideal de 50-60 %. Se stabilește iluminare artificială cu 12 ore lumină, 12 ore întineric. Se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu o sursă nelimitată de apă potabilă. Se acordă o atenție deosebită conținutului de fitoestrogen al hranei, întrucât un nivel ridicat de fitoestrogen în hrană ar putea afecta anumiți parametri de reproducere. Se recomandă hrană standardizată, cu formulă deschisă în care au fost reduse substanțele chimice estrogenice (2) (30). Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe de testat atunci când aceasta se administrează utilizând metoda de administrare prin hrană. Se verifică conținutul, omogenitatea și stabilitatea substanței de testat din hrană. Hrana și apa potabilă se analizează în mod regulat pentru detectarea contaminanților. Se păstrează probe din fiecare lot de hrană utilizat în timpul studiului în condiții adecvate (de exemplu, congelate la  $-20$  °C), până la finalizarea raportului, pentru eventualitatea în care rezultatele necesită o analiză suplimentară a ingredientelor hranei.
13. Animalele se plasează în cuști în grupuri mici de același sex și din același grup de tratament. Acestea pot fi adăpostite individual pentru a evita posibilele accidente (de exemplu, masculii după perioada de împerechere). Procedurile de împerechere se efectuează în cuști adecvate. După constatarea copulației, femelele presupuse a fi gestante sunt adăpostite separat în cuști pentru fătare sau maternitate în care li se oferă materiale definite și adecvate pentru cuiburi. Puii sunt adăpostiți cu mamele lor până la înțărare. Animalele F<sub>1</sub> se adăpostesc în grupuri mici de același sex și din același grup de tratament de la înțărare până la sacrificare. În cazul în care se justifică din punct de vedere științific, animalele pot fi adăpostite individual. Nivelul de fitoestrogeni conținut în materialul de așternut selectat trebuie să fie minim.

*Numărul și identificarea animalelor*

14. În mod normal, fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de perechi de împerechere pentru a obține cel puțin 20 de femele gestante în fiecare grup de doză. Obiectivul este producerea unui număr suficient de sarcini pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern al generației P, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F<sub>1</sub>, de la concepție până la maturitate. Dacă nu se obține numărul dorit de animale gestante, aceasta nu implică în mod necesar invalidarea studiului și situația se evaluează de la caz la caz, luând în considerare o posibilă relație cauzală cu substanța de testat.
15. Fiecărui animal P i se atribuie un număr unic de identificare înainte de începerea tratamentului. Dacă datele istorice de laborator sugerează că o proporție semnificativă de femele ar putea să nu aibă cicluri estrale regulate (de 4 sau 5 zile), atunci se recomandă o evaluare a ciclurilor estrale înainte de începerea tratamentului. În mod alternativ, se poate mări dimensiunea grupului pentru a asigura faptul că cel puțin 20 de femele din fiecare grup ar avea cicluri estrale regulate (de 4 sau 5 zile) la începutul tratamentului. Toți puii F<sub>1</sub> sunt identificați în mod unic atunci când sunt nou-născuți și sunt examinați în ziua 0 sau 1 după fătare (PND). Se păstrează înregistrări privind originea cuibului pentru toate animalele F<sub>1</sub> și animalele F<sub>2</sub>, după caz, pe tot parcursul studiului.

## ▼ M5

**Substanța chimică de testat***Informațiile disponibile cu privire la substanța chimică de testat*

16. Revizuirea informațiilor existente este importantă pentru deciziile cu privire la calea de administrare, alegerea vehiculului, selectarea speciei de animale, selectarea dozelor și eventualele modificări ale schemei de tratament. Prin urmare, toate informațiile disponibile relevante privind substanța de testat, și anume, proprietățile fizico-chimice, toxicocinetice (inclusiv metabolismul specific speciei), toxicodinamice, relațiile structură-activitate (RSA), procesele metabolice *in vitro*, rezultatele studiilor de toxicitate anterioare și informațiile relevante pe analogii structurali trebuie luate în considerare în planificarea studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. Se pot obține informații preliminare privind absorbția, distribuția, metabolismul și eliminarea (ADME) și bioacumularea din structura substanței chimice, datele fizico-chimice, dimensiunea legăturii proteinei plasmatică și studiile toxicocinetice (TK), în timp ce rezultatele studiilor de toxicitate oferă informații suplimentare, de exemplu, privind NOAEL, metabolismul sau inducerea metabolismului.

*Luarea în considerare a datelor toxicocinetice*

17. Deși nu sunt necesare, datele TK de la studiile efectuate anterior pentru stabilirea dozelor sau alte studii sunt extrem de utile pentru planificarea conceptului de studiu, selecția nivelurilor de doze și interpretarea rezultatelor. Deosebit de utile sunt datele care: 1. verifică expunerea fetoșilor și a puilor în curs de dezvoltare la substanța de testat (sau la metaboliți relevanți); 2. oferă o estimare a dozimetriei interne; și 3. evaluează potențiala saturație dependentă de doză a proceselor cinetice. De asemenea, se iau în considerare date suplimentare TK, cum ar fi profiluri de metabolit, cursuri concentrație-timp etc., dacă sunt disponibile. În timpul studiului principal, se pot colecta, de asemenea, date suplimentare TK, cu condiția ca aceasta să nu interfereze cu colectarea și interpretarea principalilor parametri de studiu.

Ca un ghid general, următoarele date TK ar fi utile în planificarea studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație:

- în ultima parte a sarcinii (de exemplu, a 20-a zi de gestație) — sânge matern și sânge fetal;
- la jumătatea perioadei de lactație (PND 10) — sânge matern, sânge de la pui și/sau lapte;
- la începutul perioadei după înțărare (de exemplu PND 28) — probe de sânge de la puii înțărcați.

Se păstrează flexibilitatea în determinarea analiților specifici (de exemplu, substanța chimică de bază și/sau metaboliți) și a schemei de eșantionare. De exemplu, numărul și calendarul de colectare a probelor într-o zi de eșantionare dată va depinde de calea de expunere și de cunoștințele anterioare privind proprietățile TK la animalele negestante. Pentru studii privind hrana, este suficientă prelevarea de probe la un singur moment din zi consecvent pentru fiecare dintre zilele de eșantionare, în timp ce administrarea prin gavaj poate impune repetări suplimentare ale prelevării de probe pentru a obține o mai bună estimare a intervalului de doze interne. Cu toate acestea, nu este necesar să se obțină concentrații în timp-curs complete în fiecare dintre zilele de eșantionare. Dacă este necesar, se colectează la comun probe de sânge în funcție de sex în cadrul cuiburilor pentru analize fetale și neonatale.



▼ **M5***Calea de administrare*

18. Selectarea căii de administrare trebuie să ia în considerare calea (căile) cea (cele) mai relevantă (relevante) pentru expunerea umană. Cu toate că protocolul este conceput pentru administrarea substanței de testat prin hrană, acesta poate fi modificat pentru administrare pe alte căi (apă potabilă, gavaj, inhalare, cutanată), în funcție de caracteristicile substanței chimice și informațiile necesare.

*Alegerea vehiculului*

19. Dacă este necesar, substanța de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, atunci când este posibil, să se utilizeze de preferat o soluție/suspensie apoasă, urmată de luarea în considerare a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb). Pentru vehicule altele decât apa, trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale vehiculului. Trebuie evitată utilizarea vehiculelor cu potențial de toxicitate intrinsecă (de exemplu, acetonă, DMSO). Se determină stabilitatea substanței de testat în vehicul. Se iau în considerare următoarele caracteristici, în cazul în care se utilizează un vehicul sau alt aditiv pentru a facilita administrarea: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau reținerii în organism a substanței de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care pot modifica caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalelor.

*Selectarea dozei*

20. În mod normal, studiul trebuie să includă cel puțin trei niveluri de doză și un martor concomitent. La selectarea nivelurilor adecvate de doză, experimentatorul trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile, inclusiv informații de dozare din studii anterioare, date TK de la animalele gestante sau negestante, gradul de transfer de lactație și estimările expunerii umane. Dacă sunt disponibile date TK care indică o saturație dependentă de doză a proceselor TK, trebuie avut grijă să se evite niveluri ridicate de doze, care manifestă în mod clar saturație, bineînțeles, dacă se preconizează că expunerile umane vor fi mult sub punctul de saturație. În astfel de cazuri, cel mai înalt nivel de doză trebuie să fie la, sau doar puțin peste, punctul de inflexiune pentru trecerea la un comportament TK neliniar.
21. În absența datelor TK relevante, nivelurile dozelor se bazează pe efectele toxice, cu excepția cazului în care acestea sunt limitate de natura fizică/chimică a substanței de testat. Dacă nivelurile dozelor se bazează pe toxicitate, se alege doza maximă cu scopul de a induce o anumită toxicitate sistemică, dar nu decesul sau suferința profundă a animalelor.
22. Se selectează o secvență descrescătoare de doze pentru a demonstra existența oricărui efect asociat dozei și pentru a stabili NOAEL sau dozele aproape de limita de detectare care ar permite obținerea unei doze de referință pentru parametrul (parametrii) cel (cei) mai sensibil(i). Pentru a evita o distanțare mare a dozelor între NOAEL și LOAEL, intervalul optim este un factor de 2 sau 4. Deseori este preferabil să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.
23. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor sunt tratate în mod identic cu subiecții din grupul de tratament. Grupul martor este netratat sau tratat cu placebo sau este un grup martor pentru vehicul în cazul în care se utilizează un vehicul în administrarea substanței de testat. În cazul în care se folosește un vehicul, grupul martor primește cel mai mare volum utilizat de vehicul.

## ▼ M5

*Testul-limită*

24. Dacă nu există semne de toxicitate la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi în studiile cu doză repetată sau dacă se preconizează toxicitate pe baza datelor de la substanțe chimice înrudite din punct de vedere structural și/sau metabolic indicând o similitudine a proprietăților metabolice *in vivo/in vitro*, ar putea să nu fie necesar un studiu care utilizează mai multe doze. În astfel de cazuri, studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație se poate realiza utilizând un grup martor și o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Cu toate acestea, în cazul în care se constată existența unor semne de toxicitate pentru reproducere sau pentru dezvoltare la doza limită, sunt necesare studii suplimentare, la doze mai mici, pentru a identifica NOAEL. Aceste considerente privind testul-limită se aplică numai atunci când expunerea umană nu impune utilizarea unei doze mai mari.

## PROCEDURI

**Expunerea puilor**

25. Expunerea alimentară este metoda de administrare preferată. Dacă se efectuează studii prin gavaj, trebuie remarcat faptul că puii vor primi în mod normal substanța de testat numai în mod indirect, prin lapte, până se începe tratarea directă a acestora la înțărare. În studiile realizate cu administrare prin intermediul hranei sau al apei potabile, puii vor primi în plus substanța de testat direct atunci când încep să mănânce singuri în ultima săptămână a perioadei de alăptare. Trebuie să se ia în considerare efectuarea unor modificări privind conceptul studiului atunci când excreția substanței de testat în lapte este slabă și în cazul în care nu se dovedește o expunere continuă a puilor. În astfel de cazuri, se ia în considerare tratarea directă a puilor în timpul perioadei de alăptare pe baza informațiilor TK disponibile, a toxicității la nivelul puilor sau a modificărilor la nivelul biomarkerilor (3) (4). Înainte de efectuarea unor studii de dozare directă asupra puilor care alăptează, ar trebui să se realizeze o analiză atentă a beneficiilor și a dezavantajelor (5).

**Programul de administrare și administrarea dozelor**

26. Unele informații cu privire la ciclurile estrale, histopatologia tractului reproducător masculin și feminin și analiza spermei testiculare/epididimale pot fi disponibile din studii anterioare de toxicitate cu doze repetate având o durată corespunzătoare. Prin urmare, durata tratamentului înainte de împerechere în cadrul studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație are drept scop depistarea efectelor asupra modificărilor funcționale care pot interfera cu comportamentul de împerechere și cu fertilizarea. Tratamentul înainte de împerechere trebuie să fie suficient de îndelungat pentru a obține condiții de expunere la o stare de echilibru la femele și masculi P. Un tratament de 2 săptămâni înainte de împerechere pentru ambele sexe este considerat suficient în majoritatea cazurilor. La femele, aceasta înseamnă 3-4 cicluri estrale complete și ar trebui să fie suficient pentru a detecta eventualele efecte adverse asupra ciclicității. La masculi, aceasta echivalează cu timpul necesar pentru tranzitul epididimal al spermatozoizilor în curs de maturizare și ar trebui să permită detectarea efectelor posttesticulare asupra spermei (în timpul etapelor finale ale generării spermei și al maturizării spermei epididimale) la împerechere. La momentul finalizării studiului, când sunt programate histopatologia testiculară și epididimală și analiza parametrilor spermei, masculii P și F<sub>1</sub> vor fi fost expuși timp de cel puțin un întreg proces de spermatogeneză [(6) (7) (8) (9), a se vedea, de asemenea, documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)].

## ▼ M5

27. Scenariile de expunere a masculilor înainte de împerechere pot fi adaptate, în cazul în care în studiile anterioare s-a constatat în mod clar toxicitate testiculară (afectarea spermatogenezei) sau efecte asupra integrității și funcției spermei. În mod similar, la femele, efectele cunoscute ale substanței de testat asupra ciclului estral și, prin urmare, asupra receptivității sexuale pot justifica diferite scenarii de expunere înainte de împerechere. În cazuri speciale, poate fi acceptabil ca tratarea femelelor P să fie inițiată numai după obținerea unui frotiu de spermă pozitiv [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)].
28. Odată stabilită perioada de tratare înainte de împerechere, animalele se tratează cu substanța de testat continuu timp de 7 zile/săptămână până la autopsie. Toate animalele se tratează utilizând aceeași metodă. Administrarea este continuată în timpul perioadei de împerechere de 2 săptămâni și, la femelele P, pe parcursul gestației și alăptării până în ziua încheierii studiului după înțarcare. Masculii se tratează în același mod până la sacrificare, atunci când animalele F<sub>1</sub> sunt înțarcate. Pentru autopsie, se acordă prioritate femelelor, care se autopsiază în aceeași zi/ziua similară de lactație. Autopsia masculilor se poate desfășura pe parcursul unui număr mai mare de zile, în funcție de dotările laboratorului. Cu excepția cazului în care este deja inițiată în timpul perioadei de alăptare, administrarea directă la masculi și la femelele selectate F<sub>1</sub> ar trebui să înceapă la înțarcare și să continue până la momentul autopsiei programate, în funcție de alocarea în cohortă.
29. Pentru substanțele chimice administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță de testat implicate nu interferează cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Atunci când substanța de testat se administrează prin intermediul hranei, se utilizează fie o concentrație dietetică constantă (ppm), fie o doză constantă în funcție de greutatea corporală a animalului; se specifică opțiunea aleasă.
30. Atunci când substanța de testat se administrează prin gavaj, volumul de lichid administrat la un moment dat nu ar trebui să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală (0,4 ml/100 g greutate corporală este maximul pentru ulei, de exemplu ulei de porumb). Cu excepția substanțelor chimice iritante sau corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai ridicate, variația volumului testat se reduce la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant pentru toate dozele. Tratamentul se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi. Doza administrată fiecărui animal se bazează în mod normal pe cea mai recentă determinare a greutății corporale individuale și se ajustează cel puțin săptămânal la masculii adulți și femelele adulte negestante și la fiecare două zile la femelele gestante și animalele F<sub>1</sub> atunci când se administrează înainte de înțarcare și în timpul celor 2 săptămâni după înțarcare. Dacă datele TK indică un transfer placentar scăzut al substanței de testat, doza de gavaj în ultima săptămână de gestație ar putea necesita o ajustare pentru a preveni administrarea unei doze excesiv de toxice femelei gestante. În ziua fătării, femelele nu trebuie tratate prin gavaj sau oricare altă cale de tratament în care animalul trebuie să fie manipulat; omiterea administrării substanței de testat în ziua respectivă este de preferat unei tulburări a procesului de fătare.

▼ **M5****Împerechere**

31. Fiecare femelă P se plasează cu un singur mascul neconsangvin selectat aleatoriu din același grup de doză (cuplare 1:1), până când se observă semne de copulație sau au trecut două săptămâni. În cazul în care nu există un număr suficient de masculi, de exemplu, ca urmare a decesului masculului înainte de împerechere, atunci masculul/masculii care s-au împerecheat se poate/pot cupla (1:1) cu o a doua femelă/femele, astfel încât toate femelele să fie cuplate. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se găsește un dop vaginal sau spermă). Animalele se separă cât mai curând posibil după ce se observă dovada copulației. În cazul în care împerecherea nu a avut loc după 2 săptămâni, animalele se separă fără o altă posibilitate de împerechere. Cuplurile împerecheate trebuie identificate în mod clar în date.

**Dimensiunea cuibului**

32. În ziua 4 după fătare, se poate ajusta dimensiunea fiecărui cuib prin eliminarea puilor în plus prin selecție aleatoare pentru a se obține, pe cât posibil, cinci masculi și cinci femele per cuib. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale, nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de cinci exemplare din fiecare sex per cuib, este acceptabilă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele).

**Selecția puilor pentru studii după înțarcare (a se vedea figura 1)**

33. La înțarcare (în jur de PND 21), se selectează puii din toate cuiburile disponibile până la 20 per doză și grupul martor pentru examinări suplimentare și se păstrează până la maturizare sexuală (dacă nu este necesară testarea mai devreme). Puii sunt selectați aleatoriu, fără a include exemplarele evident mai mici decât normal (animale cu o greutate corporală cu mai mult de două deviații standard sub greutatea medie a puilor din cuibul respectiv), deoarece este puțin probabil ca acestea să fie reprezentative pentru grupul de tratament.

La PND 21, puii F<sub>1</sub> selectați sunt repartizați aleatoriu în una dintre cele trei cohorte de animale, după cum urmează:

cohorta 1 (1A și 1B) = teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare;

cohorta 2 (2A și 2B) = teste de neurotoxicitate pentru dezvoltare;

cohorta 3 = teste de imunotoxicitate pentru dezvoltare.

Cohorta 1A: un mascul și o femelă/cuib/grup (20/sex/grup): selecție prioritară pentru evaluarea primară a efectelor asupra sistemelor de reproducere și a toxicității generale.

Cohorta 1B: un mascul și o femelă/cuib/grup (20/sex/grup): selecție prioritară pentru evaluarea de urmărire a performanței de reproducere prin împerecherea animalelor F<sub>1</sub>, atunci când este evaluată [a se vedea documentul de orientare nr. 117 al OCDE (39)] și pentru obținerea de date histopatologice suplimentare în cazuri de substanțe toxice cu efecte asupra reproducerii sau asupra glandelor endocrine sau atunci când rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare.

Cohorta 2A: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; 1 mascul sau 1 femelă per cuib) alocați pentru testare neurocomportamentală, urmată de evaluare neurohistopatologică ca adulți.

Cohorta 2B: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; 1 mascul sau 1 femelă per cuib) alocați pentru evaluare neurohistopatologică la înțarcare (PND 21 sau PND 22). În cazul în care nu există un număr suficient de animale, se acordă prioritate alocării animalelor în cohorta 2A.

▼ **M5**

Cohorta 3: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; unul per cuib, acolo unde este posibil). Se pot solicita pui suplimentari de la grupul martor pentru a acționa ca animale martor pozitiv în testul de răspuns al anticorpilor dependent de celulele T (TDAR) la  $\text{PND } 56 \pm 3$ .

34. Dacă nu există un număr suficient de pui într-un cuib pentru a servi toate cohortele, cohorta 1 are prioritate, întrucât aceasta poate fi extinsă pentru a produce o generație  $F_2$ . Se pot repartiza pui suplimentari în oricare dintre cohorte în caz de interes specific, de exemplu, în cazul unei substanțe suspectate de efecte neurotoxice, imunotoxice sau toxice pentru reproducere. Puii respectivi se pot utiliza pentru examinări la diferite momente în timp sau pentru evaluarea unor parametri suplimentari. Puii care nu au fost atribuiți în cohorte vor fi supuși la biochimie clinică (punctul 55) și autopsie macroscopică (punctul 68).

#### **A doua împerechere a animalelor P**

35. În mod normal, nu se recomandă o a doua împerechere a animalelor P, deoarece aceasta implică pierderea unor informații importante cu privire la numărul de locuri de implantare (și, astfel, se pierd date postimplantare și date privind pierderile perinatale, indicatori ai unui posibil potențial teratogen) pentru primul cuib. Necesitatea de a verifica sau de a elucida un efect la femelele expuse ar fi satisfăcută mai bine prin extinderea studiului pentru a include o împerechere a generației  $F_1$ . Cu toate acestea, o a doua împerechere a masculilor P cu femele netratate este întotdeauna o opțiune disponibilă pentru a clarifica concluziile neclare sau pentru o caracterizare suplimentară a efectelor asupra fertilității observate la prima împerechere.

### **OBSERVAȚII ÎN-VIAȚĂ**

#### **Observații clinice**

36. Pentru animalele P și animalele selectate  $F_1$ , o observație clinică generală se realizează o dată pe zi. În cazul administrării prin gavaj, momentul observației clinice trebuie să fie înainte și după administrare (pentru a observa eventuale semne de toxicitate asociate cu concentrația plasmatică maximă). Se consemnează modificările comportamentale pertinente, semnele de fătare dificilă sau prelungită și orice semne de toxicitate. De două ori pe zi, iar în timpul weekend-ului o dată pe zi, se observă toate animalele pentru semne de toxicitate severă, morbiditate și mortalitate.
37. În plus, săptămânal se efectuează o examinare mai atentă a tuturor animalelor P și  $F_1$  (după înțărare), aceasta putând fi realizată, în mod convenabil, cu ocazia cântăririi animalului, ceea ce ar reduce la minimum stresul cauzat de manipulare. Observațiile se efectuează cu atenție și se consemnează cu ajutorul sistemelor de notare care au fost definite de către laboratorul de testare. Trebuie depuse eforturi pentru a se asigura că variațiile condițiilor de testare sunt minime. Simptomele urmărite includ, dar nu se limitează la, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, dimensiunea pupilei, respirație anormală). Se consemnează, de asemenea, modificări ale mersului, ale posturii corpului, reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice sau tonice, stereotipie (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate) sau comportament bizar (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi).

▼ **M5****Greutatea corporală și consumul de hrană/apă**

38. Animalele P sunt cântărite în prima zi de tratament și cel puțin săptămânal după aceea. În plus, femelele P sunt cântărite în timpul alăptării, în aceleași zile când are loc cântărirea puilor din cuiburile lor (a se vedea punctul 44). Toate animalele F<sub>1</sub> sunt cântărite individual la înțarcare (PND 21) și cel puțin săptămânal după aceea. Greutatea corporală se consemnează, de asemenea, în ziua în care puii ajung la pubertate (finalizarea separării prepuțului sau a permeabilității vaginale). Toate animalele sunt cântărite la sacrificare.
39. Pe parcursul studiului, consumul de hrană și de apă (în cazul administrării substanței chimice în apa de băut) se consemnează cel puțin săptămânal în aceleași zile ca valorile greutatei corporale a animalelor (cu excepția perioadei de coabitare). Consumul de hrană al fiecărei cuști cu animale F<sub>1</sub> se consemnează săptămânal începând cu selectarea pentru o cohortă.

**Ciclurile estrale**

40. Informații preliminare privind efectele asociate substanței de testat asupra ciclului estral pot fi deja disponibile din studii de toxicitate anterioare cu doze repetate și pot fi utilizate pentru elaborarea unui protocol specific substanței de testat pentru studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. În mod normal, evaluarea ciclicității estrale (prin citologie vaginală) începe la începutul perioadei de tratament și continuă până la confirmarea împerecherii sau până la sfârșitul perioadei de 2 săptămâni pentru împerechere. În cazul în care femelele au fost examinate cu privire la ciclurile estrale normale înainte de tratare, este util să se continue testarea ciclicității odată cu începerea tratamentului, însă, în cazul în care există preocupări cu privire la efecte nespecifice la începutul tratamentului (de exemplu, o scădere semnificativă a consumului de hrană inițial), animalelor li se permite să se adapteze la tratament timp de cel mult două săptămâni înainte de începerea perioadei de testare a ciclicității de 2 săptămâni care conduce la cuplare. În cazul în care perioada de tratament a femelelor este extinsă în acest fel (și anume, un tratament de 4 săptămâni înainte de împerechere), trebuie să se ia în considerare achiziționarea de animale mai tinere și extinderea perioadei de tratament a masculilor înainte de cuplare. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, trebuie avut grijă să se evite orice perturbare a mucoasei și, ulterior, inducerea pseudogestației (10) (11).
41. Frotiul vaginal se examinează zilnic pentru toate femelele F<sub>1</sub> din cohorta 1A, după apariția permeabilității vaginale, până la consemnarea primului frotiu cornificat, pentru a determina intervalul de timp dintre cele două evenimente. De asemenea, se monitorizează ciclurile estrale pentru toate femelele F<sub>1</sub> din cohorta 1A pentru o perioadă de două săptămâni, începând în jurul PND 75. În plus, dacă va fi necesară împerecherea generației F<sub>1</sub>, citologia vaginală în cohorta 1B va fi urmărită de la momentul cuplării până la identificarea de dovezi ale împerecherii.

**Împerecherea și gestația**

42. Pe lângă parametrii standard (de exemplu, greutatea corporală, consumul de hrană, observațiile clinice, inclusiv controale de mortalitate/morbiditate), se consemnează datele cuplării, data inseminării și data fătării și se calculează intervalul precoital (de la cuplare la inseminare) și durata gestației (de la inseminare la fătare). Femelele P se examinează cu atenție în momentul preconizat al fătării pentru orice semne de distocie. Se consemnează orice anomalii în comportamentul de cuibărire sau în performanța alăptării.

▼ **M5**

43. Ziua în care are loc fătarea este ziua de alăptare 0 (LD 0) pentru mamă și ziua 0 după fătare (PND 0) pentru pui. Alternativ, toate comparațiile se pot baza, de asemenea, pe momentul postcoital pentru a elimina confuzia datelor de dezvoltare postnatală, scăzând durata gestației; cu toate acestea, momentul raportat la fătare este, de asemenea, consemnat. Acesta este important mai ales atunci când substanța de testat exercită o influență asupra duratei gestației.

**Parametrii puilor**

44. Fiecare cuiub se examinează cât mai curând posibil după fătare (PND 0 sau PND 1), pentru a stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, precum și prezența anomaliilor macroscopice (anomalii vizibile din exterior, inclusiv palatoschizis, hemoragii subcutanate, culoare sau textură anormală a pielii, prezența cordonului ombilical, lipsa laptelui în stomac, prezența unor secreții uscate). În plus, primul examen clinic al nou-născuților trebuie să includă o evaluare calitativă a temperaturii corpului, starea de activitate și reacția la manipulare. Puii găsiți morți la PND 0 sau la o dată ulterioară se examinează pentru determinarea posibilelor defecte și a cauzei decesului. Puii vii se numără și se cântăresc individual la PND 0 sau PND 1 și în mod regulat după aceea, de exemplu, cel puțin la PND 4, 7, 14 și 21. Examenele clinice, după caz, pentru vârsta animalelor, se repetă la cântărirea puilor sau mai des, dacă la fătare s-au realizat constatări specifice cazului. Simptomele urmărite pot include, dar nu se limitează la, anomalii exterioare, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă. Se consemnează, de asemenea, modificări ale mersului, ale posturii corpului, reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice sau tonice, stereotipie sau comportament bizar.
45. Distanța ano-genitală (DAG) la fiecare pui se măsoară cel puțin o dată de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor se consemnează în ziua în care se măsoară DAG și DAG trebuie normalizată la o măsură în funcție de dimensiunea puiului, de preferință, rădăcina cub a greutății corporale (12). Prezența sfârcurilor/aureolelor la puii de sex masculin se verifică la PND 12 sau 13.
46. Toate animalele F<sub>1</sub> selectate sunt examinate zilnic pentru constatarea separării balano-prepuțiale sau a permeabilității vaginale pentru masculi și, respectiv, femele, care începe înainte de data preconizată pentru atingerea acestor obiective, pentru a detecta dacă maturizarea sexuală se produce mai devreme. Se consemnează orice anomalii ale organelor genitale, cum ar fi fir vaginal persistent, hipospadia sau penis despicat. Maturitatea sexuală a animalelor F<sub>1</sub> se compară cu dezvoltarea fizică prin determinarea vârstei și a greutății corporale la separarea balano-prepuțială sau la deschiderea vaginală la masculi și, respectiv, la femele (13).

**Evaluarea neurotoxicității potențiale pentru dezvoltare (cohortele 2A și 2B)**

47. Pentru testele de neurotoxicitate se utilizează 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 2A și 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 2B, din fiecare grup de tratament (pentru fiecare grup: 1 mascul sau 1 femelă per cuiub; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu). Animalele din cohorta 2A trebuie să fie supuse la testul reacției auditive, o baterie de teste funcționale bazate pe observație, evaluări ale activității motorii (a se vedea punctele 48-50) și neuropatologie (a se vedea punctele 74-75). Trebuie depuse eforturi pentru a se



## ▼ M5

asigura că variațiile condițiilor de testare sunt minime și nu sunt în mod sistematic legate de tratament. Printre variabilele care pot afecta comportamentul sunt nivelul sonor (de exemplu, zgomot intermitent), temperatură, umiditate, iluminat, mirosuri, ora din zi și distrageri de mediu. Rezultatele testelor de neurotoxicitate trebuie interpretate în relație cu intervalele istorice corespunzătoare de referință pentru martor. Animalele din cohorta 2B se utilizează pentru evaluarea neuropatologică la PND 21 sau PND 22 (a se vedea punctele 74-75).

48. Un test al reacției auditive se efectuează la PND 24 ( $\pm 1$  zi) utilizând animale din cohorta 2A. Ziua de testare ar trebui compensată între grupurile tratate și martor. Fiecare sesiune este formată din 50 de teste. În efectuarea testului reacției auditive, se determină amplitudinea răspunsului mediu la fiecare bloc de 10 teste (5 blocuri de 10 teste), cu condiții de testare optimizate pentru a produce acomodare intrasesiune. Procedurile trebuie să fie în concordanță cu metoda de testare B.53 (35).
  
49. La un moment adecvat între PND 63 și PND75, animalele din cohorta 2A sunt supuse la o baterie de teste funcționale bazate pe observație și o testare automată a activității motorii. Procedurile trebuie să fie în concordanță cu metodele de testare B.43 (33) și B.53 (35). Bateria de teste funcționale bazate pe observație include o descriere amănunțită a aspectului, a comportamentului și a integrității funcționale a subiectului. Aceste aspecte sunt evaluate prin observații în cușca de adăpostire, după mutarea într-o arenă standard pentru observare (câmp deschis) unde animalul se mișcă în mod liber și prin teste de manipulare. Testarea ar trebui să pornească de la cel mai puțin activ la cel mai interactiv. O listă de măsuri este prezentată în apendicele 1. Toate animalele sunt urmărite cu atenție de către observatori instruiți, care au cunoștință de statutul de tratament al animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a reduce la minimum variabilitatea observatorului. Acolo unde este posibil, se recomandă ca același observator să evalueze animalele într-un anumit test. Dacă acest lucru nu este posibil, este necesar să se demonstreze fiabilitatea interobservatori. Pentru fiecare parametru din bateria de testare a comportamentului, se utilizează bareme și criterii de notare operaționale definite explicit. Dacă este posibil, se elaborează măsuri cantitative obiective pentru parametrii de observație, care implică un clasament subiectiv. Pentru activitatea motorie, fiecare animal este testat individual. Sesiunea de testare trebuie să fie suficient de lungă pentru a demonstra acomodarea intrasesiune pentru martori. Activitatea motorie se monitorizează prin intermediul unui dispozitiv automat de înregistrare a activității care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității (de exemplu, activitatea bazală măsurată de dispozitiv nu trebuie să fie atât de scăzută, încât să împiedice detectarea reducerii, nici atât de mare, încât să împiedice detectarea intensificării activității). Fiecare dispozitiv trebuie să fie testat prin metode standard pentru a se asigura, în măsura în care este posibil, fiabilitatea funcționării tuturor dispozitivelor în toate zilele. În măsura în care este posibil, grupurile de tratament se distribuie în mod echilibrat pe toate dispozitivele. Grupurile de tratament trebuie să fie compensate în toate intervalele de testare pentru a evita interpretări eronate provocate de ritmul circadian de activitate.
  
50. În cazul în care informațiile existente indică necesitatea altor teste funcționale (de exemplu, senzoriale, sociale, cognitive), acestea trebuie să fie integrate fără a compromite integritatea altor evaluări efectuate în cadrul studiului. În cazul în care testarea se efectuează pe aceleași animale utilizate pentru reacție auditivă, bateria de teste funcționale bazate pe observație și testarea activității motorii, trebuie să se programeze teste diferite pentru a reduce la minimum riscul de a compromite integritatea testelor. Procedurile suplimentare pot fi deosebit de utile atunci când observația empirică, efectele anticipate sau modul de acțiune/mecanismul indică un anumit tip de neurotoxicitate.



## ▼M5

**Evaluarea imunotoxicității potențiale pentru dezvoltare (cohorta 3)**

51. La PND 56 ( $\pm$  3 zile), 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 3 din fiecare grup de tratament (1 mascul sau 1 femelă per cuib; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu) se utilizează pentru testul de răspuns al anticorpilor dependent de celulele T, și anume, răspunsul anticorpilor principali IgM la un antigen dependent de celulele T, cum ar fi celule eritrocitare (Sheep Red. Blood Cells, SRBC) sau hemocianină de Limulus (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH), în conformitate cu procedurile curente de testare a imunotoxicității (14) (15). Răspunsul poate fi evaluat prin numărarea celulelor specifice formatoare de placă (PFC) în splină sau prin determinarea titrului de anticorpi IgM specifici SRBC- sau KLH- în ser prin testul ELISA, în perioada de vârf a răspunsului. De regulă, există patru răspunsuri de vârf (răspuns PFC) sau cinci (test ELISA) de zile de la imunizarea intravenoasă. În cazul în care răspunsul anticorpilor primari este analizat prin numărarea celulelor care formează placa, se permite evaluarea unor subgrupuri de animale în zile separate, cu condiția ca: imunizarea subgrupului și sacrificarea să fie programate astfel încât PFC să fie numărate în perioada de vârf a răspunsului; subgrupurile să includă un număr egal de pui de sex masculin și de sex feminin de la toate grupurile de doze, inclusiv martori; și subgrupurile să fie evaluate aproximativ la aceeași vârstă după fătare. Expunerea la substanța de testat va continua până în ziua dinaintea colectării splinei pentru răspunsul PFC sau a serului pentru testul ELISA.

**Evaluarea de urmărire a toxicității potențiale pentru reproducere (cohorta 1B)**

52. Animalele din cohorta 1B se pot menține sub tratament după PND 90 și pot fi crescute pentru a obține o generație F<sub>2</sub>, dacă este necesar. Se plasează în coabitare masculi și femele din același grup de doză (evitând cuplarea între frați) timp de până la două săptămâni, începând de la PND 90, dar fără a depăși PND 120. Procedurile trebuie să fie similare cu cele pentru animalele P. Cu toate acestea, pe baza forței probante a dovezilor, ar putea fi suficientă eliminarea puilor la PND 4, mai degrabă decât urmărirea acestora până la înțărare sau ulterior.

**OBSERVAȚIILE FINALE****Biochimie clinică/hematologie**

53. Efectele sistemice se monitorizează la animalele P. Se prelevează probe de sânge după repaus alimentar dintr-o zonă definită de la zece masculi și femele P selectați aleatoriu, pe grup de doză la sacrificare, se depozitează în condiții adecvate și se supun unei analize hematologice parțiale sau complete de biochimie clinică de T4 și TSH sau alte examene sugerate de profilul de efect cunoscut al substanței de testat [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Se examinează următorii parametri hematologici: hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de eritrocite, numărul de leucocite diferențial și total, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare a sângelui. Investigațiile plasmei sau ale serului includ: glucoză, colesterol total, uree, creatinină, proteine totale, albumină și cel puțin două enzime care indică efectele hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gama-glutamil transpeptidaza și sorbitol dehidrogenaza). Măsurători ale altor enzime și acizi biliari pot furniza informații utile în anumite circumstanțe. În plus, se poate preleva și depozita sânge de la toate animalele pentru o posibilă analiză la un moment ulterior cu scopul de a clarifica unele efecte neclare sau de a genera date de expunere internă. Dacă nu se intenționează o a doua împerechere a animalelor P, probele de

▼ **M5**

sânge sunt obținute imediat înainte de procedura de sacrificare programată sau ca parte a acesteia. În cazul în care se păstrează animalele, probele de sânge se colectează cu câteva zile înainte ca animalele să fie împerecheate pentru a doua oară. Cu excepția cazului în care datele existente de la studii cu doze repetate arată că parametrul nu este afectat de substanța de testat, analiza urinei se efectuează înainte de sacrificare, analizându-se următorii parametri: aspect, volum, osmolaritate sau densitate specifică, pH, proteine, glucoză, sânge și celule sangvine, celulele deteriorate. De asemenea, urina se poate colecta în vederea monitorizării excreției de substanță chimică de testat și/sau metabolit/metaboliți.

54. Efectele sistemice se monitorizează, de asemenea, la animalele F<sub>1</sub>. Se prelevează probe de sânge după repaus alimentar dintr-o zonă definită de la zece masculi și femele 1A selectați aleator, pe grup de doză la sacrificare, se depozitează în condiții adecvate și supun unei analize de biochimie clinică standard, inclusiv unei evaluări ale nivelului seric de hormoni tiroidieni (T4 și TSH), hematologice (leucocite diferențial și total plus numărul de eritrocite) și testul de urină.
55. Surplusul de pui la PND 4 este supus autopsiei macroscopice, avându-se în vedere măsurarea concentrației de hormon tiroidian seric (T4). În cazul în care este necesar, se poate colecta în comun sânge neonatal (PND 4) pe cuiburi pentru analize biochimice/ale hormonilor tiroidieni. De asemenea, se colectează sânge pentru analiza T4 și TSH de la pui înțărcați supuși autopsiei macroscopice la PND 22 (pui F<sub>1</sub> care nu au fost selectați pentru cohorte).

#### **Parametrii de evaluare a spermei**

56. Parametrii de evaluare a spermei se măsoară pentru toți masculii din generația P, cu excepția cazului în care există date existente pentru a demonstra că parametrii de evaluare a spermei nu sunt afectați într-un studiu de 90 de zile. Examinarea parametrilor de evaluare a spermei se realizează la nivelul tuturor masculilor din cohorta 1A.
57. La sacrificare, se consemnează valorile greutății testiculelor și a epididimului pentru toți masculii P și F<sub>1</sub> (cohorta 1A). Cel puțin un testicul și un epididim sunt rezervate pentru examenul histopatologic. Restul de epididim se utilizează pentru inventarierea rezervelor de spermă din porțiunea caudală a epididimului (16) (17). În plus, sperma din porțiunea caudală a epididimului (sau vase deferente) se colectează prin metode care reduc la minimum daunele pentru evaluarea motilității și a morfologiei (18).
58. Motilitatea spermatozoizilor poate fi evaluată imediat după sacrificare sau poate fi consemnată pentru o analiză ulterioară. Procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă ar putea fi determinat fie subiectiv, fie obiectiv prin analiza asistată de calculator a mișcării (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pentru evaluarea morfologiei spermei, se examinează o probă de spermă din epididim (sau din vasele deferente) sub formă de preparate umede sau fixe (25) și cel puțin 200 de spermatozoizi per eșantion trebuie să se clasifice ca normali (atât capul, cât și partea mijlocie/coada par normale) sau anormali. Exemple de anomalii morfologice ale spermatozoizilor includ fuziunea, capete izolate și capete și/sau cozi diforme (26). Capetele de spermatozoizi mari sau diforme pot indica defecte de spermiatje.
59. În cazul în care eșantioanele sunt congelate, frotiuri fixe și imagini pentru analiza motilității spermei sunt înregistrate la momentul autopsiei (27), analiza ulterioară putând fi limitată la masculi din grupul martor și grupul tratat cu doze ridicate. Cu toate acestea, în cazul în care se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează, de asemenea, grupurile tratate cu doze mai mici.

▼ **M5****Autopsie macroscopică**

60. La momentul sacrificării sau al decesului prematur, toate animalele P și F<sub>1</sub> sunt supuse autopsiei și sunt examinate macroscopic pentru orice anomalii structurale sau modificări patologice. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Puii care sunt eutanasiați în stare muribundă și puii morți sunt înregistrați și, atunci când nu sunt macerați, sunt examinați pentru determinarea eventualelor defecte și/sau a cauzei decesului și sunt conservați.
61. Pentru femelele adulte P și F<sub>1</sub>, se examinează un frotiu vaginal în ziua autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu examenul histopatologic la nivelul organelor de reproducere. Uterele de la toate femelele P (și femelele F<sub>1</sub>, dacă este cazul) sunt examinate pentru a determina prezența și numărul locurilor de implantare, într-un mod care să nu compromită evaluarea histopatologică.

**Greutatea organelor și conservarea țesuturilor — animale adulte P și F<sub>1</sub>**

62. La momentul sacrificării, se stabilesc valorile greutății corporale și ale greutății umede a organelor enumerate mai jos la toate animalele P și la toți adulții F<sub>1</sub> din cohortele relevante (astfel cum se arată de mai jos), cât mai curând posibil după disecție, pentru a evita uscarea. Ulterior organele trebuie conservate în condiții corespunzătoare. Dacă nu se specifică altfel, organele pereche pot fi cântărite individual sau combinat, în concordanță cu practica obișnuită a laboratorului executant:

- uterul (cu oviducte și col), ovarele;
- testiculele, epididimidele (total și partea caudală pentru probele utilizate pentru numărarea spermatozoizilor);
- prostata (părțile dorsolaterale și ventrale combinate). Trebuie să se procedeze cu atenție la curățarea complexului prostatei pentru a evita puncția veziculelor seminale umplute cu fluid. În cazul în care se constată efecte corelate tratamentului asupra greutății totale a prostatei, segmentele dorsolaterale și ventrale se disecă cu atenție după fixare și se cântăresc separat;
- veziculele seminale cu glande coagulante și fluidele lor (ca o singură unitate);
- creier, ficat, rinichi, inimă, splină, timus, glanda pituitară, glanda tiroidă (postfixare), glandele suprarenale și organe sau țesuturi țintă cunoscute.

63. Pe lângă organele enumerate mai sus, probe de nerv periferic, mușchi, măduva spinării, ochi plus nervul optic, tract gastrointestinal, vezică urinară, plămân, trahee (cu tiroida și paratiroide atașate), măduvă osoasă, vase deferente (masculi), glande mamare (masculi și femele) și vagin sunt păstrate în condiții adecvate.

64. La animalele din cohorta 1A, toate organele sunt cântărite și păstrate pentru efectuarea unui examen histopatologic.

65. Pentru investigarea efectelor imunotoxice induse pre- și postnatal, 10 masculi și 10 femele dintre animalele din cohorta 1A din fiecare grup de tratament (1 mascul sau 1 femelă per cuib; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu), vor fi supuse la următoarele teste la sacrificare:

- cântărirea ganglionilor limfatici asociați și îndepărtați de calea de expunere (pe lângă greutatea glandelor suprarenale, a timusului și a splinei, deja determinată la toate animalele din cohorta 1A);

## ▼ M5

- analiza subpopulațiilor de limfocite splenice [limfocite CD4 + și CD8 + T, limfocite B și celule ucigașe (*natural killer*, NK)] utilizând o jumătate din splină, cealaltă jumătate a splinei fiind păstrată pentru evaluarea histopatologică.

Analiza subpopulațiilor de limfocite splenice la animale neimunizate (cohorta 1A) va stabili dacă expunerea este legată de o schimbare a distribuției stării echilibrate imunologice la limfocite „ajutor” (CD4 +) sau citotoxice (CD8 +) derivate din timus sau la celule ucigașe (NK) (răspunsuri rapide la celule neoplazice și la agenți patogeni).

66. La animalele din cohorta 1B, următoarele organe sunt cântărite și țesuturile corespunzătoare sunt prelucrate în etapa bloc:

- vaginul (nu a fost cântărit);
- uterul cu colul uterin;
- ovarele;
- testiculele (cel puțin unul);
- epididimele;
- veziculele seminale și glandele coagulante;
- prostata;
- glanda pituitară;
- organele țintă identificate.

Histopatologia în cohorta 1B se efectuează în cazul în care rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare sau în cazul substanțelor suspectate de efecte toxice asupra reproducerii sau asupra glandelor endocrine.

67. Cohortele 2A și 2B: teste de neurotoxicitate pentru dezvoltare (PND 21 sau PND 22 și pui adulți). Animalele din cohorta 2A sunt sacrificate după testarea comportamentului, cu consemnarea greutății creierului și neurohistopatologie completă în scopuri de evaluare a neurotoxicității. Animalele din cohorta 2B sunt sacrificate la PND 21 sau PND 22, cu consemnarea greutății creierului și examinarea microscopică a creierului în scopuri de evaluare a neurotoxicității. Este necesară fixarea prin perfuzie pentru animalele din cohorta 2A și opțional pentru animalele din cohorta 2B, astfel cum se specifică în metoda de testare B.53 (35).

#### Greutatea organelor și conservarea țesuturilor — puii înțărcați F<sub>1</sub>

68. Puii care nu au fost selectați pentru cohorte, inclusiv puii mai mici decât normal, sunt sacrificați după înțărcare, la PND 22, cu excepția cazului în care rezultatele indică necesitatea mai multor investigații în-viață. Puii sacrificați sunt supuși autopsiei macroscopice, inclusiv o evaluare a organelor de reproducere, astfel cum este descris la punctele 62 și 63. Pentru până la 10 pui pe sex pe grup, din cât mai multe cuiburi posibil, creierul, splina și timusul se cântăresc și se păstrează în condiții adecvate. În plus, se pot păstra țesuturile mamare pentru puii de sex masculin și de sex feminin pentru mai multe analize microscopice suplimentare <sup>(1)</sup> [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Anomaliile macroscopice și țesuturile țintă se păstrează pentru o eventuală examinare histologică.

<sup>(1)</sup> Cercetările au arătat că glanda mamară, în special în ciclurile de viață timpurii ale dezvoltării glandei mamare, este un parametru sensibil pentru acțiunea estrogenilor. Se recomandă ca parametrii care implică glandele mamare ale puilor de ambele sexe să fie incluși în prezenta metodă de testare, atunci când va fi validată.

▼ **M5****Histopatologie — animalele P**

69. Se efectuează examenul histopatologic complet al organelor enumerate la punctele 62 și 63 pentru toate animalele martor P și animalele tratate cu doze ridicate. De asemenea, se examinează organele care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. În plus, organele de reproducere ale tuturor animalelor suspectate de fertilitate redusă, de exemplu, cele care nu s-au împerecheat, nu au conceput, nu au însămânțat sau nu au fătat pui sănătoși sau la care au fost afectate ciclicitatea estrală sau numărul, motilitatea sau morfologia spermatozoizilor, precum și toate leziunile macroscopice se supun evaluării histopatologice.

**Histopatologie — animalele F<sub>1</sub>***Animale din cohorta 1*

70. Se efectuează examenul histopatologic complet al organelor enumerate la punctele 62 și 63 pentru toate animalele martor adulte și animalele tratate cu doze ridicate din cohorta 1A. Toate cuiburile trebuie să fie reprezentate de cel puțin 1 pui de fiecare sex. De asemenea, se examinează organele și țesuturile care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. Pentru evaluarea efectelor induse pre- și postnatal asupra organelor limfoide, se efectuează, de asemenea, examenul histopatologic pe ganglionii limfatici colectați și măduva osoasă de la 10 masculi și 10 femele dintre animalele din cohorta 1A, pe lângă evaluarea histopatologică a timusului, a splinei și a glandelor suprarenale deja efectuate la toate animalele 1A.
71. Țesuturile de reproducere și endocrine de la toate animalele din cohorta 1B, prelucrate în etapa bloc, astfel cum este descris la punctul 66, se examinează pentru determinarea histopatologiei în cazul substanțelor suspectate de efecte toxice asupra reproducerii sau asupra sistemului endocrin. De asemenea, cohorta 1B se supune examenului histologic dacă rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare.
72. Ovarile de femele adulte trebuie să conțină foliculi primordiali și în creștere, precum și corpi galbeni; prin urmare, un examen histopatologic va viza realizarea unei evaluări cantitative a foliculilor primordiali și a foliculilor mici în creștere, precum și a corpurilor galbeni la femelele F<sub>1</sub>; numărul de animale, selectarea secțiunii ovariene și mărimea secțiunii eșantion trebuie să fie adecvate statistic pentru procedura de evaluare utilizată. Enumerarea foliculară poate fi efectuată mai întâi pe animale martor și animale tratate cu doze mari, iar în cazul unui efect advers detectat la acestea din urmă, se examinează, de asemenea, animalele tratate cu doze mai mici. Examenul include numărarea foliculilor primordiali, care pot fi combinați cu foliculi mici în creștere, pentru compararea ovarelor tratate și a ovarelor martor [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Evaluarea corpului galben se desfășoară în paralel cu testarea ciclului estral, astfel încât etapa ciclului să poată fi luată în considerare în cadrul evaluării. Oviductul, uterul și vaginul sunt examinate pentru determinarea dezvoltării corespunzătoare tipice a organelor.
73. Se efectuează examene histopatologice testiculare detaliate la masculii F<sub>1</sub> pentru a identifica efectele corelate tratamentului asupra diferențierii și dezvoltării testiculelor și asupra spermatogenezei (38). Atunci când este posibil, se examinează secțiuni ale *rete testis*. Capul, corpul și partea caudală a epididimului și vasele deferente sunt examinate pentru determinarea dezvoltării corespunzătoare tipice a organelor, precum și pentru determinarea parametrilor necesari pentru masculii P.

## ▼ M5

*Animale din cohorta 2*

74. Se efectuează examenul neurohistopatologic pentru toate animalele martor și animalele tratate cu doze mari din cohorta 2A pe sexe după încheierea testelor neuro-comportamentale (după PND 75, dar fără a depăși PND 90). Se efectuează examenul histopatologic al creierului pentru toate animalele martor și animalele tratate cu doze mari din cohorta 2B pe sexe la PND 21 sau PND 22. De asemenea, se examinează organele și țesuturile care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. Organele sau țesuturile care demonstrează modificări legate de tratament ar trebui să fie, de asemenea, examinate pentru animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la determinarea NOAEL. Pentru animalele din cohorta 2A și 2B, se examinează mai multe secțiuni de creier pentru a permite examinarea bulbilor olfactivi, a cortexului cerebral, a hipocampusului, a ganglionilor bazali, a talamusului, a hipotalamusului, a creierului mijlociu (*thecum*, *tegmentum* și pedunculi cerebrali), a trunchiului cerebral și a cerebelului. Doar pentru cohorta 2A, se examinează ochii (retina și nervul optic) și probe de nerv periferic, mușchi și măduva spinării. Toate procedurile neurohistologice trebuie să fie în concordanță cu metoda de testare B.53 (35).
75. Evaluările morfometrice (cantitative) se efectuează pe zone reprezentative ale creierului (secțiunile omoloage atent selectate pe bază de repere microscopice fiabile) și pot include măsurători liniare și/sau areale ale unor regiuni specifice ale creierului. Trebuie să se preleveze cel puțin trei secțiuni consecutive la fiecare punct de reper (nivel), pentru a selecta secțiunea omoloagă cea mai reprezentativă pentru zona specifică a creierului care va fi evaluată. Neuropatologul trebuie să decidă dacă secțiunile pregătite pentru măsurare sunt omoloage cu altele în setul de probe și, prin urmare, dacă sunt potrivite pentru a fi incluse, întrucât măsurătorile liniare, în special, se pot schimba pe o distanță relativ scurtă (28). Nu trebuie utilizate secțiuni neomoloage. În timp ce obiectivul este de a preleva probe de la toate animalele rezervate pentru acest scop (10/sex/nivel de doză), un număr mai mic de probe poate fi totuși adecvat. Cu toate acestea, prelevarea de probe de la mai puțin de 6 animale/sex/nivel de doză ar putea, în general, să nu fie considerată suficientă în scopurile prezentei metode de testare. Se poate utiliza stereologia pentru a identifica efectele legate de tratament asupra unor parametri, cum ar fi volumul sau numărul de celule pentru regiuni neuroanatomice specifice. Toate aspectele legate de pregătirea probelor de țesuturi, de la fixarea țesuturilor, la disecția de probe de țesuturi, la prelucrarea țesuturilor și până la colorarea lamelelor, trebuie să utilizeze un concept compensat, astfel încât fiecare lot să conțină probe reprezentative de la fiecare grup de doză. Atunci când urmează să se utilizeze analize morfometrice sau stereologice, țesutul cerebral trebuie integrat în medii adecvate pentru toate dozele în același timp, pentru a evita contracția probelor asociată cu depozitarea prelungită în fixativ.

## RAPORT

**Date**

76. Datele se raportează individual și se sistematizează în tabele. Acolo unde este cazul, pentru fiecare grup de testare și pentru fiecare generație, se raportează următoarele: numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte pe parcursul testului sau sacrificate fără suferință, ora oricărui deces sau eutanasier, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de femele care nasc pui și numărul de animale care prezintă semne de toxicitate. De asemenea, se raportează o descriere a toxicității, inclusiv momentul apariției, durata și severitatea.
77. Rezultatele numerice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și acceptate. Metodele statistice se selectează ca parte a conceptului de studiu și abordează în mod corespunzător datele care nu au o distribuție normală (de exemplu, date de numărare), datele cenzurate (de exemplu, timp de observare limitat), nonindependența (de exemplu, efecte care țin de seria de pui și măsuri repetate) și varianțele inegale.

▼ **M5**

Modelele mixte liniare generalizate și modelele doză-răspuns acoperă o clasă largă de instrumente analitice care ar putea fi necesare pentru datele generate în conformitate cu prezenta metodă de testare. Raportul trebuie să includă suficiente informații cu privire la metoda de analiză și programul computerizat utilizat, astfel încât un referent/statistician independent să poată evalua/reevalua analiza.

**Evaluarea rezultatelor**

78. Constatările trebuie evaluate din punct de vedere al efectelor observate, inclusiv autopsia și observațiile microscopice. Evaluarea include relația, sau inexistența acesteia, între doză și prezența, incidența și severitatea anomaliilor, inclusiv leziuni macroscopice. De asemenea, trebuie să se evalueze organele țintă, fertilitatea, anomaliile clinice, performanța de reproducere și a puilor, variații ale greutateii corporale, mortalitatea și alte efecte toxice și efectele de dezvoltare. Se acordă o atenție deosebită modificărilor specifice sexului. În evaluarea rezultatelor testelor, trebuie să se țină seama de proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat și, dacă sunt disponibile, de datele TK, inclusiv transferul placentar și excreția de lapte.

**Raportul de testare**

79. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații obținute în cadrul studiului privind animalele P, F<sub>1</sub> și F<sub>2</sub> (dacă este cazul):

*Substanța chimică de testat:*

- toate informațiile pertinente disponibile privind proprietățile chimice, toxicocinetice și toxicodinamice ale substanței chimice de testat;
- datele de identificare;
- puritate.

*Vehicul (dacă este cazul):*

- justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

*Animale de laborator:*

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpostire, hrană, materiale pentru cuibărire etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului;
- datele privind frotiul vaginal pentru femelele P înainte de începerea tratamentului (în cazul în care datele sunt colectate la acea dată);
- înregistrări privind cuplarea referitoare la generația P, indicând partenerii de sex masculin și de sex feminin ai unei împerecheri și reușita împerecherii;
- înregistrări privind cuibul de origine pentru animalele adulte din generația F<sub>1</sub>.

*Condiții de testare:*

- justificarea alegerii dozei;
- detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrațiile obținute;

▼ **M5**

- stabilitatea și omogenitatea preparatului în vehicul sau purtător (de exemplu, hrană, apă potabilă), în sânge și/sau lapte, în condiții de utilizare și depozitare între utilizări;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- conversia de la concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apă potabilă la doza obținută (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv compoziția hranei, dacă este disponibilă);
- descrierea detaliată a procedurilor de randomizare pentru a selecta puii pentru sacrificare și pentru a distribui puii în grupurile de testare;
- condiții de mediu;
- lista personalului de studiu, inclusiv de formare profesională.

*Rezultate (rezumat și date individuale pe sexe și doză):*

- consumul alimentar, consumul de apă în cazul în care este disponibil, eficiența alimentară (creștere în greutatea corporală per gram de alimente consumate, cu excepția perioadei de coabitare și în timpul alăptării) și consumul de substanță de testat (pentru administrarea prin hrană/apă potabilă) pentru animalele P și F<sub>1</sub>;
- datele privind absorbția (dacă sunt disponibile);
- informații cu privire la greutatea corporală a animalelor P;
- informații cu privire la greutatea corporală a animalelor după înțărare selectate în F<sub>1</sub>;
- momentul decesului în timpul studiului sau dacă animalele au supraviețuit sau nu până la sacrificare;
- natura, severitatea și durata efectelor clinice (eventual, reversibilitatea acestora);
- datele privind hematologia, analiza urinei și chimia clinică, inclusiv TSH și T<sub>4</sub>;
- analiza fenotipică a celulelor splenice (celulele T-, B-, NK-);
- celularitatea măduvei osoase;
- datele privind răspunsul toxic;
- numărul de femele P și F<sub>1</sub> cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;
- intervalul de timp până la împerechere (interval precoital, numărul de zile între cuplare și împerechere);
- efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, inclusiv numărul și proporția de animale care realizează împerecherea, gestația, fătarea și lactația, de masculi care induc gestația, de femele cu simptome de distocie/fătare prelungită sau dificilă;
- durata gestației și, dacă se cunoaște, a fătării;
- numărul de implantări, mărimea cuibului și procentul de pui masculi;
- numărul și procentajul de pierderi postimplantare, pui născuți vii și pui născuți morți;



**▼ M5**

- datele privind greutatea cuibului și a puilor (masculi, femele și combinat), numărul de pui mai mici decât normal, dacă s-a determinat;
- numărul de pui cu anomalii vizibile, macroscopice;
- efectele toxice sau de alt tip asupra evoluției postnatale a puilor, viabilitatea acestora etc.;
- datele privind reperele fizice la pui și alte date privind dezvoltarea postnatală;
- datele privind maturizarea sexuală a animalelor  $F_1$ ;
- datele privind observațiile funcționale la pui și adulți, după caz;
- greutatea corporală la sacrificare și datele absolute și relative de greutate a organelor pentru animalele P și animalele adulte  $F_1$ ;
- rezultatele autopsiei;
- descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;
- numărul total de spermatozoizi din epididimul caudal, procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă, procentul de spermatozoizi normali morfologic și procentul de spermatozoizi cu fiecare anomalie identificată pentru masculii P și  $F_1$ ;
- numerele și etapele de maturizare ale foliculilor din ovarele femelelor P și  $F_1$ , acolo unde este cazul;
- enumerarea de corpi galbeni din ovarele femelelor  $F_1$ ;
- prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

*Parametrii cohorței 2:*

- descrierea detaliată a procedurilor utilizate pentru a standardiza observațiile și procedurile, precum și definițiile operaționale pentru notarea observațiilor;
- lista tuturor metodelor de testare utilizate și justificarea utilizării acestora;
- detaliile privind procedurile comportamentale/funcționale, neuropatologice și morfometrice utilizate, inclusiv informații și detalii privind dispozitivele automatizate;
- procedurile de calibrare și de asigurare a echivalenței dispozitivelor și echilibrarea grupurilor de tratament în procedurile de testare;
- scurtă justificare care să explice orice decizii care implică judecata profesională;
- descrierea detaliată a tuturor constatărilor comportamentale/funcționale, neuropatologice și morfometrice pe sexe și pe grup de doză, inclusiv creșteri și scăderi față de martori;
- greutatea creierului;
- orice diagnostice derivate din simptome neurologice și leziuni, inclusiv boli sau afecțiuni care apar în mod natural;
- radiografii ale unor constatări exemplare;
- radiografii cu consum redus pentru a evalua omologia secțiunilor utilizate pentru morfometrie;

**▼ M5**

- tratarea statistică a rezultatelor, inclusiv modele statistice utilizate la analizarea rezultatelor, precum și rezultatele, indiferent dacă acestea au fost sau nu semnificative;
- relația dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței de testat, pe sexe și pe grup de doză;
- impactul oricăror informații toxicocinetice asupra concluziilor;
- date care sprijină fiabilitatea și sensibilitatea metodei de testare (de exemplu, date de martor istoric și pozitiv);
- relațiile, dacă este cazul, între efectele neuropatologice și cele funcționale;
- NOAEL sau doza de referință pentru mame și pui, pe sexe și grup de doză;
- discuții cu privire la interpretarea globală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică a provocat sau nu neurotoxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

*Parametrii cohorței 3:*

- titrele anticorpilor IgM serici (sensibilizarea la SRBC sau KLH) sau unități IgM PFC splenice (sensibilizare la SRBC);
- performanța metodei TDAR trebuie confirmată ca parte a procesului de optimizare prin inițierea de către laborator a analizei pentru prima dată și în mod periodic (de exemplu, anual) de toate laboratoarele;
- discuții cu privire la interpretarea globală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică a provocat sau nu imuno-toxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

*Discutarea rezultatelor**Concluzii, inclusiv valorile NOAEL pentru efectele asupra părinților și asupra puilor*

De asemenea, se furnizează toate informațiile care nu au fost obținute în timpul studiului, dar care sunt utile pentru interpretarea rezultatelor (de exemplu, asemănări cu efectele oricăror substanțe cunoscute cu efecte neurotoxice).

**Interpretarea rezultatelor**

80. Un studiu extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație va furniza informații privind efectele expunerii repetate la o substanță chimică în toate etapele ciclului de reproducere, după caz. În special, studiul furnizează informații cu privire la sistemul reproducător și la dezvoltarea, creșterea, supraviețuirea și parametrii funcționali ai puilor până la PND 90.
81. Interpretarea rezultatelor studiului trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța chimică, inclusiv proprietățile fizico-chimice, TK și toxicodinamice, informațiile relevante disponibile cu privire la analogi structurali, precum și rezultatele studiilor de toxicitate efectuate anterior cu substanța de testat (de exemplu, toxicitate acută, toxicitate după aplicare repetată, studii mecaniciste și studii de evaluare în cazul în care există diferențe calitative și cantitative semnificative la nivelul speciei referitoare la proprietățile metabolice *in vivo/in vitro*). Rezultatele autopsiei macroscopice și cu privire la greutatea organelor trebuie să fie evaluate în corelație cu observațiile din alte studii cu doze repetate, atunci când acest lucru este fezabil. Scăderile la nivelul dezvoltării puilor ar putea fi considerate în relație cu o influență a substanței chimice de testat asupra compoziției laptelui (29).

▼ **M5***Cohorta 2 (neurotoxicitatea pentru dezvoltare)*

82. Rezultatele neuropatologice și neurocomportamentale trebuie interpretate în contextul tuturor constatărilor, prin intermediul abordării axate pe forța probantă a dovezilor cu expertiză. Trebuie discutate modelele de constatări comportamentale sau morfologice, în cazul în care acestea sunt prezente, precum și dovezile referitoare la relația doză-efect. Evaluarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv studii epidemiologice umane sau rapoarte de caz și studii experimentale pe animale (de exemplu, datele toxicocinetice, informații de structură-activitate, date de la alte studii de toxicitate), trebuie să fie cuprinsă în caracterizare. Evaluarea datelor trebuie să includă o discuție a semnificației biologice și statistice. Evaluarea trebuie să includă relația, dacă există, între modificările neuropatologice și comportamentale observate. Pentru orientări privind interpretarea rezultatelor de neurotoxicitate pentru dezvoltare, a se vedea metoda de testare B.53 (35) și Tyl et al., 2008 (31).

*Cohorta 3 (imunotoxicitatea pentru dezvoltare)*

83. Suprimarea sau consolidarea funcției imunitare, astfel cum au fost evaluate cu ajutorul TDAR (răspunsul anticorpilor dependent de celulele T), trebuie evaluate în contextul tuturor observațiilor realizate. Semnificația rezultatului testului TDAR poate fi susținută de alte efecte asupra indicatorilor imunologici (de exemplu, celularitatea măduvei osoase, greutatea și histopatologia țesuturilor limfoide, distribuția subsetului de limfocite). Efectele stabilite de TDAR ar putea fi mai puțin semnificative în cazul altor fenomene toxice observate la concentrații de expunere mai mici.
84. Documentul de orientare nr. 43 al OCDE ar trebui să fie consultat pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și neurotoxicitatea (26).

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.
- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets, *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530-536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group, *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment, *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey, *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

## ▼ M5

- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies, *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology, *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), Cycles and Seasons, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat, *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing, *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation, *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat, *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats, *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report, *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), Methods for Assessing Rat Sperm Motility, *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration, *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations, *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

## ▼ M5

- (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations, *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants, *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
- (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
- (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), A „Best Practices” Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today, *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
- (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats, *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
- (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
- (33) Capitolul B.43 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate la rozătoare.
- (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (35) Capitolul B.53 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare.
- (36) Capitolul B.54 din prezenta anexă, Biotestul uterotrofic la rozătoare: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți estrogenice.
- (37) Capitolul B.55 din prezenta anexă, Biotestul Hershberger la șobolani: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți (anti)androgenice.

**▼ M5**

- (38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
- (39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
- (40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼ **M5***Apendicele 1***Măsurile și observațiile incluse în bateriile de teste funcționale bazate pe observație (Cohorta 2A)**

| Cuști și câmp deschis                 | Manipulare                         | Fiziologic          |
|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Postura corpului                      | Scoatere ușoară                    | Temperatură         |
| Mișcări clonice și tonice involuntare | Manipulare ușoară                  | Greutate corporală  |
| Închidere palpebrală                  | Tonus muscular                     | Reacția pupilei     |
| Erecție piloasă                       | Reacție la apropiere               | Dimensiunea pupilei |
| Salivație                             | Reacție la atingere                |                     |
| Lăcrimare                             | Reacție auditivă                   |                     |
| Vocalizări                            | Reacție la ciupirea cozii          |                     |
| Ridicare pe labele din spate          | Reacție de îndreptare              |                     |
| Anomalii de mers                      | Alunecarea piciorului la aterizare |                     |
| Excitare                              | Forță de apucare cu laba din față  |                     |
| Stereotipie                           | Forță de apucare cu laba din spate |                     |
| Comportament bizar                    |                                    |                     |
| Pete                                  |                                    |                     |
| Anomalii respiratorii                 |                                    |                     |

**▼ M5***Apendicele 2*

## DEFINIȚII

**Substanță chimică:** o substanță sau un amestec de substanțe.

**Substanță chimică de testat:** orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.



## ▼ M5

## B.57. TESTUL DE STEROIDOGENEZĂ A H295R

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 456 (2011). În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibilor perturbatori endocrini. Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini din 2002 cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică (1). Testul de steroidogeneză H295R *in vitro* (H295R) descris în prezenta metodă de testare utilizează o linie de celule adenocarcinom umane (celule NCI-H295R) și constituie un „test *in vitro*, furnizând date mecaniciste” de nivel 2, care se utilizează în scopuri de depistare și prioritizare. Dezvoltarea și standardizarea testului ca test de depistare a efectelor chimice asupra steroidogenezei, și anume, asupra producției de estradiol 17 $\beta$  (E2) și testosteron (T), s-a efectuat printr-un proces cu mai multe etape. Testul H295R a fost optimizat și validat (2) (3) (4) (5).
2. Obiectivul testului de steroidogeneză H295R este depistarea substanțelor chimice care afectează producția de E2 și T. Testul H295R este destinat identificării substanțelor xenobiotice care au ca țintă (ținte) componentele endogene care alcătuiesc mecanismul biochimic intracelular începând cu secvența de reacții de la colesterol la producerea de E2 și/sau T. Testul H295R nu este destinat identificării substanțelor chimice care afectează steroidogeneza din cauza efectelor asupra axului hipotalamic-pituitar-gonadal (HPG). Scopul testului este de a oferi un răspuns DA/NU în ceea ce privește potențialul unei substanțe chimice de a induce sau a inhiba producerea de T și E2; cu toate acestea, în unele cazuri se pot obține rezultate cantitative (a se vedea punctele 53 și 54). Rezultatele testului sunt exprimate ca modificările relative la nivelul producției de hormoni în comparație cu martorii pentru solvent (MS). Testul nu este menit să furnizeze informații referitoare la mecanismul specific privind interacțiunea substanței de testat cu sistemul endocrin. Cercetările au fost efectuate utilizând linia celulară pentru a identifica efecte asupra unor enzime specifice și hormoni intermediari, cum ar fi progesteronul (2).
3. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendice. Un protocol detaliat, inclusiv instrucțiuni privind modul de elaborare a soluțiilor, cultivarea celulelor și efectuarea diferitelor aspecte ale testului, este disponibil ca apendicele I-III la documentul OCDE „Validarea interlaboratoare a testului de steroidogeneză H295R pentru a identifica modulatori ai producției de testosteron și estradiol” (4).

## CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

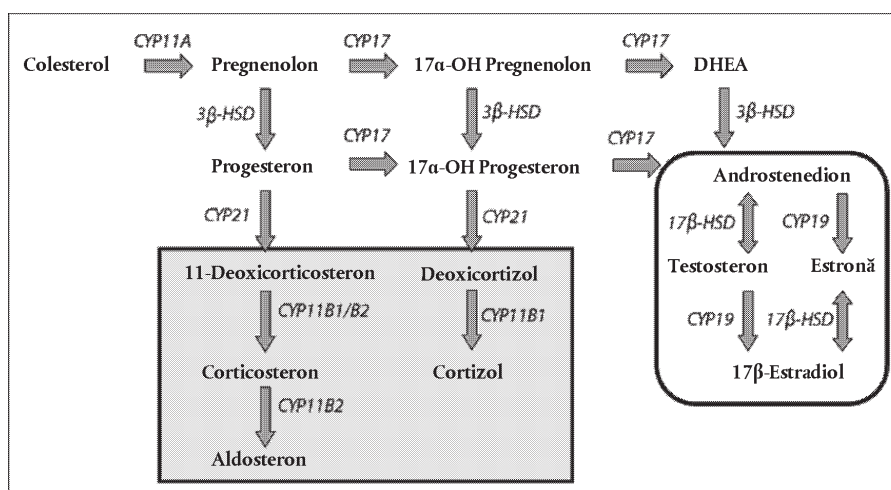
4. Cinci enzime diferite care catalizează șase reacții distincte sunt implicate în biosinteza hormonilor steroizi sexuali. Conversia enzimatică a colesterolului la pregnenolon prin enzima (CYP11A) de disociere laterală a colesterolului citocrom P450 (CYP) constituie un prim pas într-o serie de reacții biochimice care se încheie cu sinteza de steroizi ca produse finite. În funcție de ordinea următoarelor două reacții, mecanismul steroidogenic se împarte în două: mecanismul  $\Delta^5$ -hidroxisteroid și mecanismul  $\Delta^4$ ketosteroid, care converg în producția de androstendion (figura 1).
5. Androstenedionul este convertit în testosteron (T) de către dehidrogenaza 17 $\beta$ hidroxisteroidului (17 $\beta$ -HSD). Testosteronul este atât un produs intermediar, cât și un hormon produs final. La masculi, T poate fi convertit la dihidrotestosteron (DHT) de 5 $\alpha$ -reductaza, care se găsește în membranele celulare, anvelopa nucleară și reticulul endoplasmic al țesuturilor vizate de acțiunile androgenice, cum ar fi prostata și veziculele seminale. DHT este semnificativ mai puternic ca androgen decât T și este, de asemenea, considerat un hormon produs final. Testul H295R nu măsoară DHT (a se vedea punctul 10).

## ▼ M5

6. Enzima din mecanismul steroidogenic care transformă substanțele chimice androgenice în substanțe chimice estrogenice chimice este aromataza (CYP19). CYP19 transformă T în 17 $\beta$ -estradiol (E2) și androstenedion în estron. E2 și T sunt considerați hormoni produși finali pe filieră steroidogenică.
7. Specificitatea activității liazei diferă în cazul CYP17 pentru substraturile intermediare între specii. La om, enzima favorizează substraturi ale mecanismului  $\Delta^5$ -hidroxisteroid (pregnenolon), în timp ce substraturile din mecanismul  $\Delta^4$ -ketosteroid (progesteron) sunt favorizate la șobolan (19). Astfel de diferențe în activitatea liazei CYP17 pot explica unele diferențe dependente de specii, ca răspuns la substanțele chimice care modifică steroidogeneza *in vivo* (6). Celulele H295 s-au dovedit a reflecta mai îndeaproape expresia enzimei adrenale adulte umane și modelul de producere a steroizilor (20), dar se știe că acestea exprimă enzime atât pentru mecanismul  $\Delta^5$ -hidroxisteroid, cât și pentru mecanismul  $\Delta^4$ -ketosteroid pentru sinteza de androgeni (7) (11) (13) (15).

Figura 1

## Mecanismul steroidogenic în celulele H295R



## Notă:

Enzimele sunt cu caractere italice, hormonii sunt cu caractere îngroșate și săgețile indică direcția de sinteză. Fundalul gri indică mecanisme/produse corticosteroide. Mecanismele/produsele steroide sexuale sunt încercuite. CYP = citocrom P450; HSD = dehidrogenaza hidroxisteroidului; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Linia de celule adenocarcinom umane H295R este un model *in vitro* util pentru investigarea efectelor asupra sintezei de hormoni steroizi (2) (7) (8) (9) (10). Linia de celule H295R exprimă gene care codifică pentru toate enzimele cheie pentru steroidogeneza precizate mai sus (11) (15) (figura 1). Aceasta este o proprietate unică, întrucât expresia *in vivo* a acestor gene este țesutul și este specifică etapei de dezvoltare, iar, de regulă, nu există un singur țesut sau o etapă de dezvoltare care să exprime toate genele implicate în steroidogeneza (2). Celulele H295R au caracteristicile fiziologice ale celulelor adrenale fetale umane nediferențiate zonal (11). Celulele reprezintă un sistem unic *in vitro* în care acestea au capacitatea de a produce toți hormonii steroizi găsiți în cortexul adrenal și gonade la adult, permițând testarea efectelor asupra sintezei de corticosteroizi și producerea de hormoni steroizi sexuali, cum ar fi androgeni și estrogeni, deși testul a fost validat

## ▼ M5

doar pentru a detecta T și E2. Modificările înregistrate de sistemul de testare sub formă de alterare la nivelul producerii de T și E2 pot fi rezultatul unei multitudini de interacțiuni diferite ale substanțelor chimice de testat cu funcțiile steroidogene care sunt exprimate de celulele H295R. Acestea includ modularea expresiei, a sintezei sau a funcției enzimelor implicate în producerea, transformarea sau eliminarea hormonilor steroizi (12) (13) (14). Inhibarea producției de hormoni se poate datora legării concomitente de o enzimă din mecanism, impactului asupra unor cofactori precum NADPH (nicotinamida adenin dinucleotid fosfat) și AMP ciclic (adenozin monofosfat ciclic) și/sau creșterii metabolismului steroizilor sau eliminării expresiei genice a anumitor enzime implicate în steroidogeneză. În timp ce inhibarea poate fi o funcție a proceselor implicate direct sau indirect de producția de hormoni, inducția este, de regulă, de natură indirectă, de exemplu, prin afectarea unor cofactori, cum ar fi NADPH și AMP ciclic (cum este cazul forskolinului), scăderea metabolismului steroizilor (13) și reglarea în sens ascendent a expresiei steroidogenice a genei.

9. Testul H295R are mai multe avantaje:

- permite detectarea creșterilor și a scăderilor la nivelul producției de T și E2;
- permite evaluare directă a impactului potențial al unei substanțe chimice asupra viabilității/citotoxicității celulare. Aceasta este o caracteristică importantă, deoarece permite discriminarea între efectele determinate de citotoxicitate de cele determinate de interacțiunea directă a substanțelor chimice cu mecanismele steroidogenice, ceea ce nu este posibil în sisteme de explanturi de țesut care constau în mai multe tipuri de celule de diferite niveluri de sensibilitate și funcționalități;
- nu implică utilizarea animalelor;
- linia de celule H295R este disponibilă în comerț.

10. Principalele limitări ale testului sunt următoarele:

- capacitatea sa metabolică este necunoscută, dar probabil destul de limitată; prin urmare, substanțele chimice care trebuie să fie activate metabolic vor fi probabil ratate în cadrul testului;
- fiind derivat din țesut adrenal, H295R posedă enzimele capabile să producă gluco- și mineralocorticoizi, precum și hormoni sexuali; astfel, efectele asupra producției de gluco- și mineralocorticoizi ar putea influența nivelurile de T și E2 observate în test;
- nu măsoară DHT și, prin urmare, nu este de așteptat să detecteze substanțele chimice care împiedică 5 $\alpha$ -reductaza, caz în care poate fi utilizat testul Hershberger (16);
- testul H295R nu va identifica substanțele chimice care interferează cu steroidogeneza prin afectarea axului hipotalamic-pituitar-gonadal (HPG), întrucât acest aspect poate fi studiat doar la animale intacte.

Principiul testului

11. Scopul testului este de a detecta substanțele chimice care afectează producția de T și E2. T este, de asemenea, un intermediar în mecanismul de producere a E2. Testul poate detecta substanțele chimice care, de regulă, inhibă sau induc enzimele implicate în steroidogeneză.

## ▼ M5

12. Testul se desfășoară în mod normal în condiții standard de cultură a celulelor pe plăci de cultură cu 24 de godeuri. Alternativ, se pot utiliza alte dimensiuni de plăci pentru efectuarea testului; cu toate acestea, condițiile de semănare și experimentale trebuie ajustate în consecință pentru a menține aderarea la criteriile de performanță.
13. După o perioadă de aclimatizare de 24 de ore în plăci cu godeuri multiple, celulele se expun timp de 48 de ore la șapte concentrații ale substanței chimice de testat în cel puțin trei exemplare. Solventul, precum și un inhibitor și un inductor de producție de hormoni cunoscuți sunt utilizați la o concentrație fixă, ca martori negativi și pozitivi. La sfârșitul perioadei de expunere, mediul este îndepărtat din fiecare godeu. Viabilitatea celulară din fiecare godeu este analizată imediat după îndepărtarea mediului. Concentrațiile de hormoni din mediu se pot măsura utilizând diverse metode, inclusiv truse de măsurare a nivelurilor de hormoni disponibile în comerț și/sau tehnici instrumentale precum cromatografia lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS). Datele sunt exprimate ca multiplu de schimbare în raport cu martorul pentru solvent și concentrația cea mai mică cu efect observat (CMEO). În cazul în care testul este negativ, cea mai mare concentrație testată este raportată ca fiind concentrația fără efect observat (CFEO). Concluziile cu privire la capacitatea unei substanțe chimice de a afecta steroidogeneza trebuie să se bazeze pe cel puțin două serii de teste independente. Primul test aplicat poate funcționa ca un test de identificare a intervalului cu ajustare ulterioară a concentrațiilor pentru testele 2 și 3, dacă este cazul, în cazul în care există probleme de solubilitate sau de citotoxicitate sau activitatea substanței chimice pare a fi la sfârșitul intervalului de concentrații testate.

## PROCEDURA DE CULTIVARE

## Linie de celule

14. Celulele NCI-H295R sunt disponibile comercial de la American Type Culture Collections (ATCC), la semnarea unui acord de transfer de material (MTA) <sup>(1)</sup>.

## Introducere

15. Datorită schimbărilor intervenite la nivelul capacității celulelor de producție de E2 la îmbătrânire/reînsămânțare (2), celulele se cultivă urmând un protocol specific înainte ca acestea să fie utilizate și se notează numărul de reînsămânțări de când celulele au fost decongelate, precum și numărul reînsămânțării la care celulele au fost congelate și introduse în azot lichid pentru stocare. Primul număr indică numărul curent de reînsămânțare al celulelor și cel de-al doilea număr indică numărul de reînsămânțare la care celulele au fost congelate și stocate. De exemplu, celulele care au fost congelate după reînsămânțarea cinci și dezghețate, iar ulterior au fost separate de trei ori (4 reînsămânțări, numărând celulele proaspăt decongelate ca reînsămânțarea 1) după ce au fost cultivate din nou ar fi etichetate drept reînsămânțarea 4.5. Un exemplu de sistem de numerotare este ilustrat în apendicele I din raportul de validare (4).
16. Se utilizează mediul stoc ca bază pentru mediile de completare și de congelare. Mediul de completare este o componentă necesară pentru cultivarea celulelor. Mediul de congelare este conceput anume pentru a permite congelarea celulelor fără impact asupra acestora, pentru stocare pe termen lung. Înainte de utilizare, Nu-serum [sau un ser comparabil ca proprietăți, care s-a demonstrat că produce date care satisfac performanța testelor și cerințele de control al calității (CC)], care este un element constitutiv al mediilor de completare, trebuie analizat pentru identificarea concentrațiilor de fond T și E2. Prepararea soluțiilor este descrisă în apendicele II la raportul de validare (4).

<sup>(1)</sup> ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, disponibil la <http://www.lgcstandards-atcc.org/>

## ▼ M5

17. După inițierea unei culturi de celule H295R pornind de la un lot inițial ATCC, celulele sunt cultivate pentru cinci însămânțări (și anume, celulele sunt separate de 4 ori). Celulele de însămânțare 5 sunt ulterior congelate în azot lichid pentru stocare. Înainte de congelarea celulelor, se aplică un eșantion de celule anterioare de reînsămânțarea 4 pe o placă CC (a se vedea punctele 36 și 37) pentru a verifica dacă producția bazală de hormoni și răspunsul la substanțele martor pozitive îndeplinesc criteriile de control ale testului calității, astfel cum sunt definite în tabelul 5.
18. Celulele H295R trebuie să fie cultivate, congelate și stocate în azot lichid pentru a se asigura că există întotdeauna celule de reînsămânțarea/vârsta corespunzătoare disponibile pentru cultivare și utilizare. Numărul maxim de însămânțări după luarea unui lot nou <sup>(1)</sup> sau congelat <sup>(2)</sup> de celule în cultură care este acceptabil pentru utilizare în testul H295R nu trebuie să depășească 10. De exemplu, însămânțările acceptabile pentru culturile de celule dintr-un lot congelat la reînsămânțarea 5 ar urma să fie de 4.5 până la 10.5. Pentru inițierea celulelor din loturile congelate, se respectă procedura descrisă la punctul (19). Celulele se cultivă pentru cel puțin patru (4) însămânțări suplimentare (reînsămânțarea 4.5) înainte de a fi utilizate în test.

**Celulele de plecare din rezerva congelată**

19. Procedura de inițiere a celulelor din rezerva congelată se utilizează atunci când un nou lot de celule este scos din depozitul de azot lichid pentru cultivare și testare. Detaliile procedurii sunt prevăzute în apendicele III la raportul de validare (4). Celulele se extrag din depozitul de azot lichid, se decongelează rapid, se introduc într-un mediu de completare într-un tub de centrifugă, sunt centrifugate la temperatura camerei, resuspendate în mediu de completare și transferate într-o balon de cultură. Mediul trebuie să fie schimbat în ziua următoare. Celulele H295R sunt cultivate într-un incubator la 37 °C în atmosfera de aer cu 5 % CO<sub>2</sub> și mediul este reînnoit de 2-3 ori pe săptămână. Atunci când celulele sunt aproximativ 85-90 % confluențe, acestea trebuie să fie divizate. Divizarea celulelor este necesară pentru a se asigura sănătatea și creșterea celulelor și pentru a păstra celule pentru efectuarea de bioteste. Celulele sunt clătite de trei ori cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS, fără Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>) și se eliberează din balonul de cultură prin adăugarea unei enzime de detașare adecvate, de exemplu, tripsina, în PBS (fără Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>). Imediat ce celulele se desprind de balonul de cultură, acțiunea enzimei ar trebui să fie oprită prin adăugarea unui mediu de completare la un raport de 3 × volumul utilizat pentru tratamentul enzimatic. Celulele sunt introduse într-un tub de centrifugă, centrifugate la temperatura camerei, supernatantul se elimină, iar extractul concentrat de celule se resuspendă în mediu de completare. Cantitatea corespunzătoare de soluție de celule se introduce într-un nou vas de cultură. Cantitatea de soluție de celule se ajustează astfel încât celulele să fie confluențe în 5-7 zile. Raportul recomandat de sub-cultivare este de 1: 3 și 1: 4. Placa se etichetează cu atenție. În această etapă celulele sunt gata pentru a fi utilizate la testare și celulele suplimentare trebuie să fie congelate în azot lichid, astfel cum se specifică la punctul 20.

<sup>(1)</sup> „Lot nou” înseamnă un nou lot de celule primit de la ATCC.

<sup>(2)</sup> „Lot congelat” înseamnă celulele care au fost cultivate anterior și ulterior congelate la un laborator altul decât ATCC.

▼ **M5****Congelarea celulelor H 295R (prepararea celulelor pentru stocare în azot lichid)**

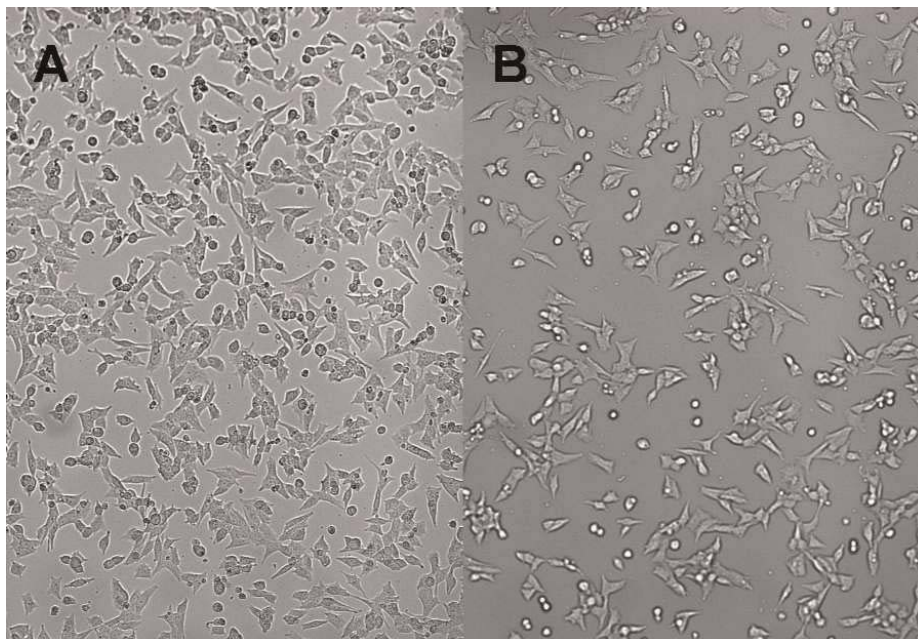
20. Pentru a prepara celulele H 295R pentru congelare, procedura descrisă mai sus pentru separarea celulelor trebuie urmată până la treapta pentru resuspendarea concentratului de celule din partea de jos a tubului de centrifugare. În această etapă, concentratul de celule se re-suspendă în mediul de congelare. Soluția este transferată într-un flacon criogenic, etichetat în mod corespunzător și congelat la  $-80^{\circ}\text{C}$  timp de 24 h, după care flaconul de criogenie este transferat în azot lichid pentru stocare. Detaliile procedurii sunt prevăzute în apendicele III la raportul de validare (4).

**Plasarea pe plăci și preincubarea celulelor pentru testare**

21. Numărul de plăci cu 24 de godeuri, preparate astfel cum s-a specificat la punctul 19, care vor fi necesare depinde de numărul de substanțe chimice care urmează să fie testate și de confluența celulelor în vasele de cultură. Ca regulă generală, un balon de cultură ( $75\text{ cm}^2$ ) cu 80-90 % celule conflente va furniza suficiente celule pentru una până la 1,5 plăci (cu 24 de godeuri), la o densitate țintă de 200 000 până la 300 000 celule/ml de mediu care rezultă în aproximativ 50-60 % confluență în godeuri la 24 de ore (figura 2). Aceasta este, în mod normal, densitatea celulară optimă pentru producția de hormoni în cadrul testului. La densități mai mari, modelele de producție ale T și E2 se modifică. Înainte de a efectua testul prima dată, se recomandă să se testeze diferite densități de însămânțare între 200 000 și 300 000 celule/ml și se recomandă selectarea densității care rezultă într-o confluență de 50-60 % în godeu la 24 de ore pentru experiențe suplimentare.

*Figura 2*

**Fotomicrografie a celulelor H295R la o densitate de însămânțare de 50 % într-o placă de cultură cu 24 de godeuri și preluate la 24 de ore la marginea (A) și în centrul (B) al unui godeu.**



22. Mediul este pipetat din balonul de cultură, iar celulele sunt spălate de 3 ori cu PBS sterilă (fără  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ ). Se adaugă soluție enzimatică (în PBS) pentru desprinderea celulelor de balonul de cultură. După o perioadă adecvată pentru detașarea celulelor, acțiunea enzimei trebuie să fie oprită prin adăugarea unui mediu de completare într-un raport de  $3\times$  volumul



**▼M5**

utilizat pentru tratamentul enzimatic. Celulele sunt introduse într-un tub de centrifugă, centrifugate la temperatura camerei, supernatantul se elimină, iar extractul concentrat de celule se resuspendă în mediu de completare. Densitatea celulară se calculează utilizând, de exemplu, un hemocitometru sau un contor de celule. Soluția de celule se diluează până la densitatea dorită pentru placare și este amestecată cu atenție, pentru a asigura densitatea celulară omogenă. Celulele sunt dispuse pe placă cu 1 ml soluție de celule/godeu, iar plăcile și godeurile se etichetează. Plăcile însă-mânțate se incubează la 37 °C în atmosferă de aer cu sub 5 % CO<sub>2</sub> timp de 24 de ore pentru a permite celulelor să se atașeze la godeuri.

**CERINȚE DE CONTROL AL CALITĂȚII**

23. Este esențial ca în timpul administrării să se furnizeze volumele exacte ale soluțiilor și ale eșantioanelor în godeuri, întrucât volumele determină concentrațiile utilizate în calculele de analiză a rezultatelor.
  24. Înainte de a iniția cultura celulară și testarea ulterioară, fiecare laborator trebuie să demonstreze sensibilitatea sistemului său de măsurare a hormonilor (punctele 29-31).
  25. În cazul în care se vor utiliza teste de măsurare a hormonilor pe bază de anticorpi, substanțele chimice supuse testului trebuie analizate pentru a identifica potențialul acestora de a interfera cu sistemul de măsurare utilizat pentru a cuantifica T și E2, astfel cum se indică la punctul 32, înainte de începerea testării.
  26. DMSO este solventul recomandat pentru test. Dacă se utilizează un alt solvent, trebuie să se determine următoarele:
    - solubilitatea substanței chimice de testat, forskolin și procloraz în solvent; și
    - citotoxicitatea în funcție de concentrația de solvent.
- Concentrația maximă admisibilă a solventului se recomandă să nu depășească o diluție 10 × din cea mai mică concentrație citotoxică a solventului.
27. Înainte de a efectua testarea pentru prima dată, laboratorul trebuie să efectueze un experiment de calificare care să demonstreze faptul că acesta este în măsură să mențină și să obțină culturile celulare corespunzătoare și condițiile experimentale necesare pentru analize chimice, astfel cum se specifică la punctele 33-35.
  28. La începerea testării prin utilizarea unui nou lot, trebuie să se realizeze o placă de control înainte de a utiliza un nou lot de celule pentru a evalua performanța celulelor conform descrierii de la punctele 36 și 37.

**Performanța sistemului de măsurare a hormonilor**

*Sensibilitatea, exactitatea, precizia și trans-reactivitatea metodei cu matrice eșantion*

29. Fiecare laborator poate utiliza un sistem de măsurare a hormonilor la alegerea sa pentru analiza producției de T și E2 de către celulele H295R, cu condiția ca acesta să îndeplinească criteriile de performanță, inclusiv limita de cuantificare (LC). Nominal, acestea sunt de 100 pg/ml pentru T și de 10 pg/ml pentru E2, valori care se bazează pe nivelurile bazale ale hormonilor observate în studiile de validare. Cu toate acestea, niveluri mai mari sau mai mici pot fi adecvate, în funcție de nivelurile bazale ale hormonilor înregistrate în laboratorul în care se efectuează studiul. Înainte de inițierea plăcii CC și a ciclurilor de teste, laboratorul trebuie să

## ▼ M5

demonstreze că analiza hormonului de utilizat poate măsura concentrațiile de hormon în mediul de completare cu suficientă acuratețe și precizie, pentru a se îndeplini criteriile CC prevăzute în tabelele 1 și 5, analizând mediul de completare la care s-a adăugat un martor hormon intern. La mediul de completare se adaugă cel puțin trei concentrații din fiecare hormon (de exemplu, 100, 500 și 2 500 pg/ml de T; 10, 50 și 250 pg/ml de E2; sau se pot utiliza concentrațiile cele mai mici posibile bazate pe limitele de detectare ale sistemului ales de măsurare a hormonilor pentru cele mai mici variabilități ale concentrației de T și E2) și se analizează. Concentrațiile măsurate ale hormonilor în eșantioanele neextrase trebuie să fie în limita a 30 % din concentrațiile nominale, iar diferențele între măsurătorile duble pentru aceeași probă nu trebuie să depășească 25 % (a se vedea, de asemenea, tabelul 8 pentru noi criterii CC). În cazul în care sunt îndeplinite criteriile CC, se presupune că analiza testului selectat pentru măsurarea hormonilor este suficient de precisă și nu provoacă o reacție încrucișată cu componentele din mediu (matricea eșantion), astfel încât să fie preconizată o influență semnificativă asupra rezultatului testului. În acest caz, nu este necesară o extracție de eșantioane înainte de măsurarea hormonilor.

30. În cazul în care nu sunt îndeplinite criteriile CC din tabelele 1 și 8, poate apărea un important efect de matrice și trebuie să se efectueze un experiment cu mediu extras contaminat. Un exemplu de procedură de extracție este descris în apendicele II la raportul de validare (4). Măsurarea concentrațiilor de hormoni în eșantioanele extrase se efectuează în trei exemplare <sup>(1)</sup>. În cazul în care se poate dovedi că, după extracție, componentele mediului nu interferează cu metoda de depistare a hormonilor, astfel cum se definește în criteriile CC, orice alte experimente trebuie să se efectueze cu eșantioane extrase. În cazul în care criteriile CC nu pot fi îndeplinite după extragere, sistemul utilizat pentru măsurarea hormonilor nu este adecvat pentru scopul testului de steroidogeneză H295R și trebuie să se utilizeze o altă metodă de detectare a hormonilor.

#### *Curba standard*

31. Concentrațiile de hormon ale probelor martor pentru solvent (MS) trebuie să se situeze în porțiunea liniară a curbei standard. De preferință, valorile MS ar trebui să fie în apropierea centrului porțiunii liniare pentru a garanta că se poate măsura inducerea și inhibarea sintezei de hormoni. Diluțiile de mediu (sau extras) de măsurat se selectează în consecință. Relația liniară se determină printr-o abordare statistică adecvată.

#### *Interferența substanței de testat*

32. În cazul în care se vor utiliza teste pe bază de anticorpi, cum ar fi testul de absorbție imunoenzimatică ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) și testele de radioimunodotare (Radio-Immuno Assays, RIA) pentru a măsura valorile hormonilor, fiecare substanță chimică trebuie să fie testată pentru o posibilă interferență cu sistemul de măsurare a hormonilor care va fi utilizat înainte de inițierea efectivă a substanțelor chimice [apendicele III la raportul de validare (4)], întrucât unele substanțe chimice pot interfera cu testele (17). Dacă apare interferența, și anume,  $\geq 20$  % din producția bazală de hormoni pentru T și/sau E2, astfel cum este stabilită de analiza hormonilor, testul de stabilire a interferenței asupra analizei hormonilor chimici [astfel cum este descris în apendicele III la raportul de validare (4), secțiunea 5.0] ar trebui să se aplice la toate diluțiile de soluție stoc ale substanței chimice testate pentru a identifica doza prag la care are loc o interferență semnificativă ( $\geq 20$  %). În cazul în care interferența nu depășește 30 %, rezultatele pot fi corectate ținând cont de interferență. În

<sup>(1)</sup> Notă: În cazul în care este necesar, se efectuează trei măsurători identice pentru fiecare extract. Fiecare eșantion va fi extras doar o singură dată.



▼ **M5**

cazul în care interferența depășește 30 %, datele nu sunt valabile și datele la concentrațiile respective trebuie să fie eliminate. În cazul în care are loc o interferență semnificativă a substanței chimice de testat cu un sistem de măsurare a hormonilor la nivelul mai multor concentrații necitotoxice, trebuie utilizat un alt sistem de măsurare a hormonilor. În vederea evitării interferenței unor substanțe chimice contaminante, se recomandă ca hormonii să fie extrași din mediu utilizând un solvent adecvat, metodele posibile putând fi consultate în raportul de validare (4).

Tabelul 1

**Criterii de performanță pentru sistemele de măsurare a hormonilor**

| Parametru  | Criteriu  |
|--|---|
| Sensibilitatea metodei de măsurare   | Limita de cuantificare (LC)<br>T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml <sup>(a)</sup>  |
| Eficiența extracției hormonilor (numai în cazul în care extracția este necesară) | Ratele de recuperare medii (pe baza a trei măsurători duplicate) pentru cantitățile de hormoni îmbogățite nu trebuie să se abată cu mai mult de 30 % de la cantitatea care a fost adăugată.                         |
| Interferența substanței (numai sistemele bazate pe anticorpi)                    | Nu ar trebui să se manifeste nicio trans-reactivitate substanțială ( $\geq 30$ % din producția bazală de hormoni a hormonului respectiv) cu oricare dintre hormonii produși de celule <sup>(b)</sup> <sup>(c)</sup> |

<sup>(a)</sup> Notă: Limitele metodei de măsurare se bazează pe valorile bazale ale producției de hormoni prevăzute în tabelul 5 și sunt bazate pe performanță. Dacă se poate obține o producție mai mare de hormoni, limita poate fi mai ridicată.

<sup>(b)</sup> Unii anticorpi T și E2 pot reacționa încrucișat cu androstendion și, respectiv, estron la un procent mai mare. În astfel de cazuri, nu se pot stabili cu precizie efectele asupra 17 $\beta$ -HSD. Cu toate acestea, datele pot furniza în continuare informații utile referitoare la efectele asupra producției de estrogen sau androgen în general. În astfel de cazuri, datele se exprimă ca răspunsuri de estrogen și androgen, mai degrabă decât E2 și T.

<sup>(c)</sup> Acestea includ: colesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxicorticosteron, corticosteron, aldosteron, 17 $\alpha$ -pregnenolon, 17 $\alpha$ -progesteron, deoxicortizol, cortizol, DHEA, androstendion, estron.

**Testul de competență a laboratorului**

33. Înaintea testării unor substanțe chimice necunoscute, un laborator trebuie să demonstreze că poate să obțină și să mențină o cultură de celule adecvată și condițiile de testare necesare pentru desfășurarea cu succes a testului de competență a laboratorului. Întrucât performanța unei analize este direct legată de personalul de laborator care efectuează testul, procedurile ar trebui să fie parțial repetate în cazul în care apare o modificare a personalului de laborator.
34. Testul de competență se va efectua în aceleași condiții enumerate la punctele 38-40, prin expunerea celulelor la 7 concentrații gradate de inductori și inhibitori puternici, moderați și slabi, precum și o substanță negativă (a se vedea tabelul 2). În mod specific, substanțele chimice de testat includ inductorul puternic forskolin (CAS nr. 66575-29-9); inhibitorul

▼ **M5**

puternic procloraz (CAS nr. 67747-09-5); inductorul moderat atrazină (CAS nr. 1912-24-9); inhibitorul moderat aminoglutetimidă (CAS 125-84-8); inductorul slab (producție E2) și inhibitorul slab bisfenol A (producție T) (CAS nr. 80-05-7); și substanța chimică negativă gonadotropina corionică umană (HCG) (CAS nr. 9002-61-3) astfel cum se arată în tabelul 2. Se aplică plăci separate pentru toate substanțele chimice, utilizând formatul specificat în tabelul 6. O placă CC (tabelul 4, punctele 36-37) se include zilnic în testele pentru substanțele chimice de verificare.

Tabelul 2

**Substanțe chimice de testat și concentrațiile de expunere**

| Substanțe chimice de verificare | Concentrațiile de testare [μM]                    |
|---------------------------------|---|
| Procloraz                       | 0 <sup>(a)</sup> , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 |
| Forskolin                       | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30   |
| Atrazină                        | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100   |
| Aminoglutetimidă                | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100   |
| Bisfenol A                      | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100   |
| HCG                             | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100   |

<sup>(a)</sup> Martor (0) pentru solvent (DMSO), 1 μl DMSO/godeu.

Expunerea H295R la substanțele chimice de verificare trebuie realizată pe plăci de 24 de godeuri în timpul testului de competență a laboratorului. Stabilirea dozelor se realizează în μM pentru toate substanțele de testat. Dozele se administrează în DMSO la 0,1 % v/v în fiecare godeu. Toate concentrațiile trebuie să fie testate în trei godeuri duplicate (tabelul 6). Fiecare substanță chimică se testează pe plăci separate. O placă CC este inclusă în fiecare zi de desfășurare.

35. Analizele de viabilitate celulară și a hormonilor se desfășoară astfel cum se prevede la punctele 42-46. Valoarea prag (CMEO) și decizia de clasificare ar trebui să fie raportate și comparate cu valorile din tabelul 3. Datele sunt considerate acceptabile în cazul în care acestea îndeplinesc CFEO și deciziile de clasificare din tabelul 3.

Tabelul 3

**Valorile prag (CMEO) și deciziile de clasificare a substanțelor chimice de testat**

|                  | CAS nr.    | CMEO [μM] |       | Decizie de clasificare      |              |
|------------------|------------|-----------|-------|-----------------------------|--------------|
|                  |            | T         | E2    | T                           | E2           |
| Procloraz        | 67747-09-5 | ≤ 0,1     | ≤ 1,0 | + <sup>(a)</sup> (Inhibare) | + (Inhibare) |
| Forskolin        | 66575-29-9 | ≤ 10      | ≤ 0,1 | + (Inducere)                | + (Inducere) |
| Atrazina         | 1912-24-9  | ≤ 100     | ≤ 10  | + (Inducere)                | + (Inducere) |
| Aminoglutetimidă | 125-84-8   | ≤ 100     | ≤ 100 | + (Inhibare)                | + (Inhibare) |

## ▼ M5

|            | CAS nr.   | CMEQ [ $\mu$ M] |           | Decizie de clasificare |              |
|------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------|--------------|
|            |           | T               | E2        | T                      | E2           |
| Bisfenol A | 80-05-7   | $\leq 10$       | $\leq 10$ | + (Inhibare)           | + (Inducere) |
| HCG        | 9002-61-3 | n/a             | n/a       | Negativ                | Negativ      |

(<sup>a</sup>) +, pozitiv

n/a: nu se aplică deoarece nu apare nicio modificare după expunerea la concentrații necitotoxice de martor negativ.

#### Placa de control al calității

36. Placa de control al calității (CC) este utilizată pentru a verifica performanța celulelor H295R în conformitate cu condițiile standardului de cultivare și pentru a stabili o bază de date istorice privind concentrațiile de hormoni în martorii pentru solvent, martorii pozitivi și martorii negativi, precum și alte măsuri de control al calității în timp.

— performanța celulelor H295R trebuie să fie evaluată utilizând o placă CC pentru fiecare lot nou de la ATCC sau după utilizarea pentru prima dată a unei rezerve de celule congelată anterior, cu excepția cazului în care testul de competență a laboratorului (punctele 32-34) s-a efectuat pe lotul de celule respectiv;

— o placă CC oferă o evaluare completă a condițiilor de testare (de exemplu, viabilitate celulară, martori pentru solvent, martori pozitivi și negativi, precum și variabilitate intra- și intertest) pentru testarea de substanțe chimice și trebuie să facă parte din fiecare ciclu de test.

37. Testul CC este efectuat utilizând o placă cu 24 de godeuri și urmează aceleași proceduri de incubare, dozare, viabilitate/citotoxicitate celulară, extracție hormonală și analiză hormonală descrise la punctele 38-46 pentru testarea substanțelor chimice. Placa CC conține spații libere, martori pentru solvent și două concentrații ale unui inductor (forskolin, 1, 10  $\mu$ M) și inhibitor cunoscut (procloraz, 0,1, 1  $\mu$ M) al sintezei de E2 și T. În plus, în godeuri selectate se utilizează MeOH ca martor pozitiv pentru testul de viabilitate/citotoxicitate. În tabelul 4 se găsește o descriere detaliată a aspectului plăcii. În tabelul 5 sunt enumerate criteriile care trebuie îndeplinite cu privire la placa CC. Trebuie să se obțină producția minimă bazală de hormoni pentru T și E2 atât în martorul pentru solvent, cât și în godeurile libere.

Tabelul 4

**Aspectul plăcii de control al calității pentru testarea competenței celulelor H295R neexpușe și a celulelor expuse la inhibitori (PRO = procloraz) și stimulatori cunoscuți (FOR = forskolin) ai producției de E2 și T. După încheierea experimentului de expunere și îndepărtarea mediului, se adaugă o soluție de metanol MeOH 70 % la toate godeurile pentru a servi ca martor pozitiv pentru citotoxicitate [a se vedea testul de citotoxicitate în apendicele III la raportul de validare (4)]**

|   | 1                                  | 2                                  | 3                                  | 4   | 5   | 6   |
|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|---|---|
| A | spațiu liber ( <sup>a</sup> )      | spațiu liber ( <sup>a</sup> )      | spațiu liber ( <sup>a</sup> )      | spațiu liber ( <sup>a</sup> )<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> )      | spațiu liber ( <sup>a</sup> )<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> )      | spațiu liber ( <sup>a</sup> )<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> )      |
| B | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> ) | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> ) | DMSO ( <sup>c</sup> )<br>1 $\mu$ l<br>(+ MeOH) ( <sup>b</sup> ) |

## ▼ M5

|   | 1              | 2              | 3              | 4               | 5               | 6               |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| C | FOR 1 $\mu$ M  | FOR 1 $\mu$ M  | FOR 1 $\mu$ M  | PRO 0,1 $\mu$ M | PRO 0,1 $\mu$ M | PRO 0,1 $\mu$ M |
| D | FOR 10 $\mu$ M | FOR 10 $\mu$ M | FOR 10 $\mu$ M | PRO 1 $\mu$ M   | PRO 1 $\mu$ M   | PRO 1 $\mu$ M   |

(<sup>a</sup>) Celulele din godeurile libere primesc numai mediu (și anume, fără solvent).

(<sup>b</sup>) Metanolul (MeOH) se adaugă după încheierea expunerii, iar mediul este îndepărtat din godeurile respective.

(<sup>c</sup>) Martor pentru solvent DMSO (1  $\mu$ l/godeu).

Tabelul 5

## Criterii de performanță pentru placa de control al calității

|   | T  | E2   |
|---|--|--|
| Producția bazală de hormoni în martorul pentru solvent (MS) | $\geq 5$ ori limita de cuantificare (LC) | $\geq 2,5$ ori limita de cuantificare (LC) |
| Inducere (10 $\mu$ M forskolin)                             | $\geq 1,5$ ori MS                        | $\geq 7,5$ ori MS                          |
| Inhibare (1 $\mu$ M procloraz)                              | $\leq 0,5$ ori MS                        | $\leq 0,5$ ori MS                          |

## PROCEDURA DE EXPUNERE LA SUBSTANȚE CHIMICE

38. Celulele preincubate sunt scoase din incubator (punctul 21) și se verifică la microscop pentru a se asigura că sunt în stare bună (fixare, morfologie) înainte de dozare.
39. Celulele sunt plasate într-un dulap de biosecuritate, iar mediul de completare este eliminat și înlocuit cu un nou mediu de completare (1 ml/godeu). DMSO este solventul preferat pentru prezenta metodă de testare. Cu toate acestea, în cazul în care există motive pentru a folosi alți solvenți, se prezintă justificarea științifică pentru aceasta. Celulele sunt expuse la substanța de testat prin adăugarea a 1  $\mu$ l de soluție stoc corespunzătoare în DMSO [a se vedea apendicele II la raportul de validare (4)] per 1 ml de mediu de completare (volumul godeului). Aceasta conduce la o concentrație finală de 0,1 % DMSO în godeuri. Pentru a asigura amestecarea adecvată, se preferă, în general, ca soluția stoc corespunzătoare de substanță de testat din DMSO să fie amestecată cu mediu de completare, astfel încât să se obțină concentrația finală dorită pentru fiecare doză, iar amestecul se adaugă în fiecare godeu imediat după îndepărtarea mediului vechi. Dacă se utilizează această opțiune, concentrația de DMSO (0,1 %) trebuie să fie consecventă în toate godeurile. Godeurile care conțin cele mai mari două concentrații sunt evaluate vizual, cu ajutorul unui microscop stereoscopic, pentru a verifica formarea de precipitate sau aspectul tulbure ca o indicație a solubilității incomplete a substanței de testat. În cazul în care se observă astfel de condiții (formarea de precipitate, aspect tulbure), se examinează, de asemenea, godeurile care conțin următoarele concentrații mai mici (și așa mai departe), iar concentrațiile care nu sunt complet dizolvate în soluție urmează să fie excluse de la evaluare și analiză suplimentară. Placa este pusă din nou în incubator la 37 °C în atmosferă de aer cu sub 5 % CO<sub>2</sub> timp de 48 ore. În tabelul 6 se prezintă aspectul plăcii substanței de testat. Stocurile 1-7 indică plasarea de doze din ce în ce mai mari ale substanței de testat.

## ▼ M5

Tabelul 6

**Schema dozării pentru expunerea celulelor H295R la substanțe chimice de testat într-o placă cu 24 de godeuri**

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | DMSO   | DMSO   | DMSO   | Stoc 4 | Stoc 4 | Stoc 4 |
| B | Stoc 1 | Stoc 1 | Stoc 1 | Stoc 5 | Stoc 5 | Stoc 5 |
| C | Stoc 2 | Stoc 2 | Stoc 2 | Stoc 6 | Stoc 6 | Stoc 6 |
| D | Stoc 3 | Stoc 3 | Stoc 3 | Stoc 7 | Stoc 7 | Stoc 7 |

40. După 48 ore de expunere, plăcile sunt scoase din incubator și fiecare godeu este verificat la microscop pentru a determina starea celulelor (fixare, morfologie, grad de confluență) și semne de citotoxicitate. Mediul din fiecare godeu este împărțit în două părți egale (aproximativ 490  $\mu$ l fiecare) și este transferat în două flacoane separate etichetate corespunzător (de exemplu, o alicotă pentru a furniza un eșantion de rezervă pentru fiecare godeu). Pentru a preveni uscarea celulelor, mediul este înlăturat câte un rând sau o coloană o dată și se înlocuiește cu mediul pentru testul de viabilitate/citotoxicitate celulară. Dacă viabilitatea/citotoxicitatea celulară nu se măsoară imediat, se adaugă 200  $\mu$ l PBS cu  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{Mg}^{2+}$  la fiecare godeu. Mediile sunt congelate la  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  până la prelucrarea ulterioară pentru analizarea concentrațiilor de hormoni (a se vedea punctele 44-46). În timp ce T și E2 în mediu păstrat la  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sunt, în general, stabili timp de cel puțin 3 de luni, stabilitatea hormonilor în timpul stocării trebuie documentată în fiecare laborator.

41. Imediat după înlăturarea mediului, se determină viabilitatea/citotoxicitatea celulară pentru fiecare placă de expunere.

**Determinarea viabilității celulare**

42. Un test de viabilitate/citotoxicitate a celulelor la alegere poate fi utilizat pentru a determina impactul potențial al substanței de testat asupra viabilității celulelor. Testul trebuie să poată furniza o măsură reală a procentului de celule viabile prezente într-un godeu sau trebuie să se demonstreze că aceasta este direct comparabilă cu (o funcție liniară din) testul celule vii/moarte (Live/Dead® Assay) [a se vedea apendicele III la raportul de validare (4)]. O altă analiză care s-a dovedit că funcționează la fel de bine este testul MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil] tetrazoliu] (18). Evaluarea viabilității celulare prin metodele de mai sus reprezintă o măsurare relativă care nu prezintă neapărat relații liniare cu numărul absolut de celule dintr-un godeu. Prin urmare, analistul ar trebui să efectueze o evaluare vizuală paralelă subiectivă a fiecărui godeu, se fac fotografii digitale ale MS și primele două cele mai mari concentrații necitotoxice trebuie să fie prelevate și arhivate pentru a permite evaluări ulterioare ale densității celulare reale, dacă acest lucru este necesar. În cazul în care, prin inspecție vizuală sau astfel cum demonstrează testul de viabilitate/citotoxicitate, se pare că există o creștere a numărului de celule, creșterea aparentă trebuie să fie verificată. În cazul în care se confirmă o creștere a numărului de celule, acest lucru trebuie specificat în raportul testului. Viabilitatea celulară se exprimă în raport cu răspunsul mediu în MS, care se consideră a fi 100 % celule viabile, și se calculează în funcție de testul de viabilitate/citotoxicitate celulară care este utilizat. Pentru MTT, se poate utiliza următoarea formulă:

▼ **M5**

**% celule viabile** = (răspuns în godeu – răspunsul mediu în godeuri tratate cu MeOH [= 100 % moarte]) ÷ (răspunsul mediu în godeuri MS – răspunsul mediu în godeuri tratate cu MeOH [= 100 % moarte])

43. Godeurile cu viabilitate mai mică de 80 % în raport cu viabilitatea medie în MS (= 100 %) nu ar trebui să fie incluse în analiza finală a datelor. Inhibarea steroidogenezei care se produce în prezența unui nivel de aproape 20 % citotoxicitate trebuie evaluată cu atenție pentru a se asigura că nu citotoxicitatea este cauza inhibării.

**Analiza hormonilor**

44. Fiecare laborator poate utiliza un sistem de măsurare a hormonilor la alegerea sa pentru analiza T și E2. Se pot utiliza părți alicote de rezervă de mediu de la fiecare grup de tratament pentru a prepara diluții pentru a aduce concentrația în partea liniară a curbei standard. Astfel cum s-a menționat la punctul 29, fiecare laborator trebuie să demonstreze conformitatea sistemului său de măsurare hormonală (de exemplu, ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) cu criteriile CC prin analizarea mediului de completare la care se adaugă un martor hormon intern înainte de a efectua testele CC sau testarea substanțelor chimice. Pentru a se asigura că niciuna dintre componentele sistemului de testare nu interferează cu măsurarea hormonilor, ar putea fi necesar ca hormonii să fie extrași din medii înainte de măsurarea acestora (a se vedea punctul 30 pentru condițiile în care o extracție este sau nu necesară). Se recomandă să se efectueze extracția urmând procedurile specificate în apendicele III la raportul de validare (4).
45. În cazul în care pentru măsurarea producției de hormoni se utilizează o trusă de testare comercială, analiza hormonală trebuie efectuată astfel cum se precizează în manualele furnizate de producătorul trusei de testare. Majoritatea producătorilor au o procedură unică prin care se efectuează analizele hormonale. Diluțiile de probe trebuie să fie ajustate astfel încât concentrațiile preconizate de hormoni la martorii pentru solvent să se afle în centrul intervalului liniar al curbei standard a testului individual [apendicele III la raportul de validare (4)]. Valorile care depășesc porțiunea liniară a curbei standard trebuie să fie respinse.
46. Concentrațiile hormonale finale sunt calculate după cum urmează:

Exemplu:

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Extrase:                         | 450 µl mediu   |
| Reconstituite în:                | 250 µl tampon de analiză   |
| Diluire în test:                 | 10:1 (pentru a aduce eșantionul la intervalul liniar al curbei standard) |
| Concentrația de hormoni în test: | 150 pg/ml (adaptat deja la concentrația per ml de probă testată)         |
| Redresare:                       | 89 %   |
| Concentrația hormonală finală =  | Concentrația de hormoni (per ml) ÷ recuperare (factorul de diluție)      |
| Concentrația hormonală finală =  | (150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10<br>= 936,3 pg/ml             |

## ▼ M5

**Selecția concentrațiilor de testare**

47. Ar trebui să se efectueze un minim de două serii de teste independente. Cu excepția cazului în care informații prealabile, cum ar fi informații cu privire la limitele de solubilitate sau citotoxicitate, oferă o bază pentru alegerea concentrațiilor de testare, se recomandă ca pentru testul inițial concentrațiile de testare să fie distanțate la intervale logaritmice de 10,  $10^{-3}$  M fiind concentrația maximă. În cazul în care substanța chimică este solubilă și nu este citotoxică la niciuna dintre concentrațiile testate, iar primul test a fost negativ pentru toate concentrațiile, acest lucru trebuie să fie confirmat prin efectuarea încă a unui test în aceleași condiții în care s-a efectuat primul test (tabelul 7). În cazul în care rezultatele primului test sunt *neclare* (și anume, coeficientul de modificare este semnificativ statistic de la MS la o singură concentrație) sau *pozitive* (și anume, coeficientul de modificare la două sau mai multe concentrații adiacente este semnificativ statistic), testul trebuie repetat, astfel cum se indică în tabelul 7, prin rafinarea concentrațiilor de testare selectate. Concentrațiile de testare din ciclurile de teste doi și trei (dacă este cazul) trebuie să fie ajustate în funcție de rezultatele ciclului inițial de teste care au valori de o parte și de alta a concentrațiilor care au provocat un efect, utilizând o spațiere de concentrare de 1/2-log (de exemplu, dacă ciclul inițial de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000  $\mu$ M a condus la inducere la 1 și 10  $\mu$ M, concentrațiile testate în al doilea ciclu de teste trebuie să fie de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M), cu excepția cazului în care trebuie să se utilizeze concentrații mai mici pentru obține CMEQ. În acest din urmă caz, în cel de-al doilea ciclu de teste se vor utiliza cel puțin cinci concentrații sub cea mai mică concentrație testată în primul ciclu de teste, utilizând o scară de 1/2-log. În cazul în care al doilea ciclu de teste nu confirmă primul ciclu de teste (și anume, nu apare o semnificație statistică la concentrația testată anterior pozitiv  $\pm 1$  variație de concentrație), se va efectua un al treilea experiment utilizând condițiile inițiale de testare. Rezultatele *neclare* din primul ciclu de teste se consideră *negative* în cazul în care efectul observat nu a putut fi confirmat în oricare dintre cele două cicluri ulterioare. Rezultatele *neclare* sunt considerate *răspunsuri* (efect) *pozitive* atunci când răspunsul poate fi confirmat în cel puțin încă un ciclu de teste cu un interval de creștere a concentrației de  $\pm 1$  (a se vedea punctul 55 pentru procedura de interpretare a datelor).

Tabelul 7

**Matrice de decizii pentru posibile scenarii de rezultat**

| Ciclul 1              | Ciclul 2                       |          | Ciclul 3                       |          | Decizie |         |
|-----------------------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|---------|---------|
| Scenariu              | Decizie                        | Scenariu | Decizie                        | Scenariu | Pozitiv | Negativ |
| Negativ               | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Negativ  | Stop                           |          |         | X       |
| Negativ               | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Pozitiv  | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Negativ  |         | X       |
| Neclar <sup>(c)</sup> | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Negativ  | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Negativ  |         | X       |
| Neclar <sup>(c)</sup> | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Negativ  | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Pozitiv  | X       |         |
| Neclar <sup>(c)</sup> | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Pozitiv  |                                |          | X       |         |
| Pozitiv               | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Negativ  | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Pozitiv  | X       |         |

## ▼ M5

| Ciclul 1 | Ciclul 2                       |          | Ciclul 3                       |          | Decizie |         |
|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|---------|---------|
| Scenariu | Decizie                        | Scenariu | Decizie                        | Scenariu | Pozitiv | Negativ |
| Negativ  | De confirmat <sup>(a)</sup>    | Pozitiv  | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Pozitiv  | X       |         |
| Pozitiv  | De perfecționat <sup>(b)</sup> | Pozitiv  | Stop                           |          | X       |         |

<sup>(a)</sup> Se confirmă ciclul anterior utilizând același concept experimental.

<sup>(b)</sup> Se reia testul la o spațiere a concentrației de 1/2-log (valorile de o parte și de alta a concentrației care a testat în mod semnificativ diferit în experimentul precedent).

<sup>(c)</sup> Coeficientul de modificare la o singură concentrație este semnificativ diferit statistic de MS.

#### Controlul de calitate al plăcii de testare

48. În plus față de respectarea criteriilor pentru placa CC, trebuie să se respecte și alte criterii de calitate, care se referă la variația acceptabilă între godeuri duplicate, experimente duplicate, liniaritatea și sensibilitatea sistemelor de măsurare hormonală, variabilitatea între măsurătorile hormonale duplicate ale aceleiași probe și recuperarea procentuală de vârfuri hormonale după extracția mediului (dacă este cazul; a se vedea punctul 30 în ceea ce privește cerințele de extracție), acestea fiind prezentate în tabelul 8. Datele trebuie să se încadreze în intervalele acceptabile definite pentru fiecare parametru care urmează să fie luat în considerare pentru o evaluare suplimentară. În cazul în care criteriile nu sunt îndeplinite, tabelul trebuie să menționeze că nu s-au îndeplinit criteriile de CC în eșantionul respectiv, iar eșantionul se analizează din nou sau se elimină din setul de date.

Tabelul 8

#### Intervale și/sau variație acceptabile (%) pentru parametrii plăcii de testare a testului H295R

(LC: limita de cuantificare a sistemului de măsurare hormonală. CV: coeficient de variație; MS: martor pentru solvent; DPM: dezintegrări pe minut)

|  | Comparație între                                     | T              | E2        |
|--|--|----------------|-----------|
| Producția hormonală bazală în MS   | Coeficient mai mare decât LC                         | ≥ 5 ori        | ≥ 2,5 ori |
| Experimente de expunere — CV pentru aceeași placă pentru MS (godeuri duplicate)        | Concentrații absolute                                | ≤ 30 %         | ≤ 30 %    |
| Experimente de expunere — CV între plăci pentru MS (experimente duplicate)             | Coeficient de modificare                             | ≤ 30 %         | ≤ 30 %    |
| Sistemul de măsurare hormonală — sensibilitate   | Scădere a coeficientului detectabilă în raport cu MS | ≥ 5 ori        | ≥ 2,5 ori |
| Sistemul de măsurare hormonală — CV pentru măsurare duplicată pentru MS <sup>(a)</sup> | Concentrații absolute                                | ≤ 25 %         | ≤ 25 %    |
| Extracția mediului — recuperarea standardului intern 3H (dacă este cazul)              | DPM  | ≥ 65 % nominal |           |

<sup>(a)</sup> Se referă la măsurări duplicate ale aceleiași probe.



▼ **M5****ANALIZA DATELOR ȘI RAPORTARE****Analiza datelor**

49. Pentru a evalua creșterea/descrășterea relativă la nivelul producției hormonale modificate chimic, rezultatele ar trebui să fie normalizate la valoarea medie MS a fiecărei plăci de testare, iar rezultatele ar trebui să fie exprimate ca modificări față de MS în fiecare placă de testare. Toate datele sunt exprimate ca medie  $\pm$  1 deviație standard (DS).
50. Numai datele privind hormonii din godeurile unde citotoxicitatea a fost sub 20 % ar trebui să fie incluse în analiza datelor. Modificările relative se calculează după cum urmează:

**Schimbare relativă** = (concentrația de hormoni din fiecare godeu)  $\div$  (concentrația de hormoni medie în toate godeurile martor pentru solvent).

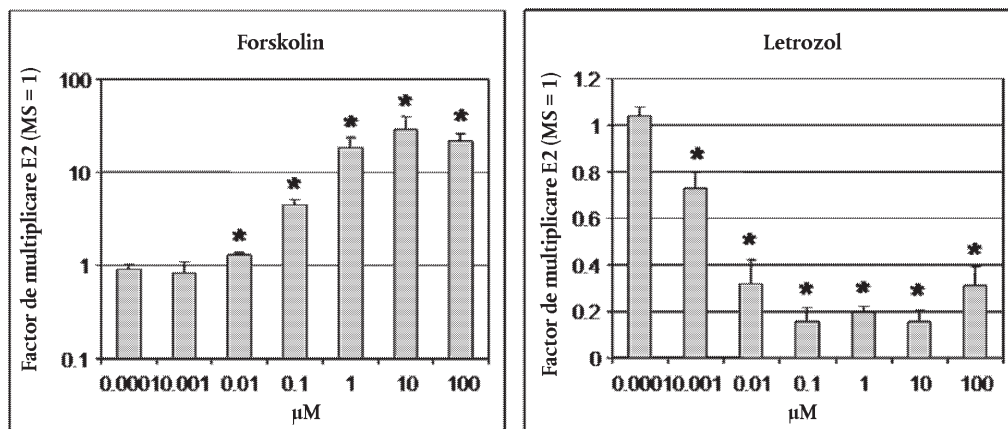
51. În cazul în care, prin inspectarea vizuală a godeului sau astfel cum demonstrează testul de viabilitate/citotoxicitate descris la punctul 42, se pare că nu există o creștere a numărului de celule, creșterea aparentă trebuie să fie confirmată. În cazul în care o creștere a numărului de celule este confirmată, acest lucru trebuie specificat în raportul de testare.
52. Înainte de a efectua analize statistice, trebuie să se evalueze ipotezele de normalitate și de omogenitate a varianței. Normalitatea se evaluează utilizând reprezentări grafice standard ale probabilităților sau alte metode statistice adecvate (de exemplu, testul Shapiro-Wilk). În cazul în care datele (coeficientul de modificare) nu au o distribuție normală, se poate încerca transformarea datelor pentru a aproxima o distribuție normală. Dacă datele prezintă o distribuție normală sau aproximează o distribuție normală, trebuie să se analizeze diferențele dintre grupurile de concentrație a substanței chimice și MS cu ajutorul unui test parametric (de exemplu, testul Dunnett), *concentrația* fiind variabila independentă și *răspunsul* (coeficientul de modificare) fiind variabila dependentă. În cazul în care datele nu au o distribuție normală, se utilizează un test non-parametric adecvat (de exemplu, testul de clasificare mulți-unul Kruskal Wallis, Steel). Diferențele sunt considerate semnificative la  $p \leq 0,05$ . Evaluările statistice sunt efectuate pe baza valorilor medii pentru fiecare godeu care reprezintă puncte de reper duplicate independent. Se preconizează că, datorită spațierii mari a dozelor în primul ciclu de teste (scară logaritmică  $\log_{10}$ ), în multe cazuri nu va fi posibil să se descrie în mod clar relațiile concentrație-răspuns în care cele mai mari două doze se vor afla pe porțiunea liniară a curbei sigmoid. Prin urmare, pentru primul ciclu de teste sau alte seturi de date în care apare această situație (de exemplu, în cazul în care nu se poate estima o eficiență maximă), se aplică statistici variabile fixe de tip I, astfel cum sunt descrise mai sus.
53. În cazul în care mai mult de două puncte de date se află pe porțiunea liniară a curbei și se pot calcula eficacități maxime — se anticipează pentru unele dintre ciclurile secunde de teste care sunt efectuate utilizând o spațiere semi-logaritmică a concentrațiilor de expunere — trebuie să se utilizeze un probit, logit sau alte modele de regresie corespunzătoare pentru a calcula concentrații efective (de exemplu,  $EC_{50}$  și  $EC_{20}$ ).
54. Rezultatele trebuie să fie prezentate atât în forme grafice (histograme care reprezintă DS medie  $\pm$  1), cât și în tabele (CMEO/CFEO, direcția efectului și magnitudinea răspunsului maxim care face parte din porțiunea de date care prezintă o relație doză-răspuns) (pentru un exemplu, a se vedea figura 3). Evaluarea datelor este considerată valabilă doar în cazul în care aceasta s-a bazat pe cel puțin două cicluri de teste desfășurate în mod independent. Un experiment sau un ciclu de teste este considerat independent în cazul în care acesta a fost executat la o altă dată cu ajutorul unui nou set de soluții și martori. Intervalul de concentrații utilizat în ciclurile de teste 2 și 3 (în cazul în care este necesar) se poate adapta pe baza rezultatelor ciclului 1 pentru o mai bună definire a intervalului doză-efect care include CMEO (a se vedea punctul 47).

▼ **M5**

Figura 3

**Exemplu de prezentare și evaluare a datelor obținute pe durata derulării testului H295R în format grafic și de tabel**

[Asteriscurile indică diferențe semnificative statistic față de martorul pentru solvent ( $p < 0,05$ ). CMEO: concentrația cea mai mică cu efect observabil; Modificare maximă: magnitudinea maximă a răspunsului observat la orice concentrație în raport cu răspunsul mediu al MS (= 1)]



| Substanța chimică | CMEO  | Modificare maximă |
|-------------------|-------|-------------------|
| Forskolin         | 0,01  | 0,15 ori          |
| Letrozol          | 0,001 | 29 ori            |

**Procedura de interpretare a datelor**

55. O substanță chimică de testat se consideră a fi pozitivă în cazul în care coeficientul de inducție este diferit din punct de vedere statistic ( $p \leq 0,05$ ) față de martorul pentru solvent la două concentrații adiacente în cel puțin două cicluri independente de teste (tabelul 7). O substanță chimică de testat se consideră a fi negativă în urma a două cicluri independente de teste cu rezultat negativ, sau în urma a trei cicluri care cuprind două cicluri de teste negative și un ciclu neclar sau pozitiv. În cazul în care datele obținute în trei experimente independente nu îndeplinesc criteriile de decizie enumerate în tabelul 7, rezultatele experimentale nu sunt interpretabile. Rezultatele la concentrații care depășesc limitele de solubilitate sau la concentrații citotoxice nu trebuie să fie incluse în interpretarea rezultatelor.

**Raportul de testare**

56. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

*Unitatea de testare*

- denumirea unității, localizarea;
- directorul studiului și alți membri ai personalului și responsabilitățile acestora în cadrul studiului;
- datele de început și de sfârșit ale studiului.

**▼ M5***Substanța chimică de testat, reactivi și martori*

- identitatea (nume/nr. CAS, după caz), sursa, numărul lotului, puritatea, furnizorul și caracterizarea substanței chimice de testat, reactivi și martori;
- natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanței de testat;
- condițiile de stocare și metoda și frecvența preparării substanțelor de testare, a reactivilor și a martorilor;
- stabilitatea substanței chimice de testat.

*Celule*

- sursa și tipul de celule;
- numărul de reînsămânțări (identificator de reînsămânțare celulară) ale celulelor utilizate în test;
- descrierea procedurilor de păstrare a culturilor de celule.

*Cerințe înainte de testare (dacă este cazul)*

- descrierea și rezultatele testului de interferență al testului hormon chimic;
- descrierea și rezultatele măsurătorilor eficienței de extracție a hormonilor;
- curbele standard și etalonare pentru toate testele analitice care trebuie efectuate;
- limitele de detecție pentru testele analitice selectate.

*Condiții de testare*

- compoziția mediilor de cultură;
- concentrația substanței de testat;
- densitatea celulară (concentrații celulare estimate sau măsurate la 24 de ore și la 48 de ore);
- solubilitatea substanței de testat (limita de solubilitate, în cazul în care este stabilită);
- durata și condițiile de incubație.

*Rezultatele testului*

- datele neprelucrate pentru fiecare godeu pentru martori și substanțele chimice de testat — fiecare măsură duplicată sub forma datelor originale furnizate de instrumentul utilizat pentru a măsura producția de hormoni (de exemplu, OD, unități de fluorescență, DPM etc.);
- validarea normalității sau explicațiile privind transformarea datelor;
- răspunsurile medii  $\pm 1$  SD pentru fiecare godeu măsurat;
- datele privind citotoxicitatea (concentrațiile de testare care au determinat citotoxicitate);
- confirmarea faptului că au fost îndeplinite cerințele de control al calității;

## ▼M5

- modificarea relativă în comparație cu martorul pentru solvent rectificat pentru citotoxicitate;
- un grafic care să indice modificarea relativă (coeficient de modificare) la fiecare concentrație, SD și semnificația statistică, astfel cum s-a precizat la punctele 4954.

*Interpretarea datelor*

- se aplică procedura de interpretare a datelor la rezultate și se discută observațiile.

*Discuție*

- Există indicații din studiu în ceea ce privește posibilitatea ca datele referitoare la T/E2 să fi fost influențate de efecte indirecte asupra mecanismelor gluco- și mineralocorticoizilor?

*Concluzii***BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex.
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23-30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Disponibil la [[http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Disponibil la: [[http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Disponibil la: [[http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis\\_drpfinal\\_3\\_29\\_05.pdf](http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drpfinal_3_29_05.pdf)]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.

## ▼M5

- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Capitolul B.55 din prezenta anexă: Biotestul Hershberger la șobolani: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți (anti)androgenice.
- (17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.

▼ **M5***Apendice***DEFINIȚII**

**Confluență** înseamnă acoperirea sau proliferarea permisă celulelor pe sau în tot mediul de cultură.

**Substanță chimică** înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

**CV** înseamnă coeficientul de variație și este definit ca raportul dintre deviația standard a distribuției la media sa aritmetică.

**CYP** înseamnă mono-oxigenazele citocromului P450, o familie de gene și enzimele produse din acestea, care sunt implicate în cataliza unei largi varietăți de reacții biochimice, inclusiv sinteza și metabolismul hormonilor steroizi.

**DPM** înseamnă dezintegrări pe minut. Este vorba despre numărul atomilor dintr-o cantitate dată de materiale radioactive, care este detectată că s-ar fi dezintegrat într-un minut.

**E2** înseamnă 17 $\beta$ -estradiol, cel mai important estrogen din sistemele mamiferelor.

**Celulele H295R** sunt celule adenocarcinom umane care au caracteristicile fiziologice ale celulelor adrenale fetale umane nediferențiate zonal și care exprimă toate enzimele implicate în steroidogeneză. Acestea sunt disponibile de la ATCC.

**Mediul de congelare** este utilizat pentru a congela și a stoca celulele congelate. Acesta se compune din mediu de stoc plus BD NuSerum și dimetilsulfoxid.

**Interval liniar** înseamnă intervalul în curba standard pentru un sistem de măsurare a hormonilor unde rezultatele sunt proporționale cu concentrația de analit prezent în probă.

**LC** înseamnă „limita de cuantificare” și este cea mai mică cantitate a unei substanțe chimice care poate fi distinsă de absența substanței respective (o valoare blank) cuprinsă într-un interval de încredere declarat. În scopul prezentei metode, LC este definit, de regulă, de către producătorul sistemelor de testare, dacă nu se specifică altfel.

**CME0** înseamnă concentrația cea mai mică cu efecte observate, cel mai scăzut nivel de concentrație la care răspunsul este diferit statistic de cel al martorului pentru solvent.

**CFE0** înseamnă concentrația fără efect observat, care este cea mai mare concentrație testată la care testul nu furnizează un răspuns pozitiv.

**Reînsămânțare** înseamnă numărul de repetări ale procedurii prin care celulele sunt împărțite după inițierea unei culturi din stoc congelat. Reînsămânțarea inițială care a pornit de la stocul congelat primește numărul unu (1). Celulele care au fost împărțite o dată sunt etichetate ca reînsămânțarea 2 etc.

**PBS** este soluția salină tamponată cu fosfat Dulbecco.

**Controlul calității**, abreviat CC, înseamnă măsurile necesare pentru a asigura date valide.

**Placă de control al calității** înseamnă o placă cu 24 de godeuri care include două concentrații de martori pozitivi și negativi pentru a monitoriza performanța unui nou lot de celule sau pentru a furniza martorii pozitivi pentru probă la testarea substanțelor chimice.

**Test preliminar** înseamnă un experiment independent, caracterizat printr-un nou set de soluții și martori.

**▼ M5**

**Mediu de stoc** înseamnă baza pentru prepararea altor reactivi. Acesta constă într-un amestec 1:1 de mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) și amestec nutritiv F-12 Ham (DMEM/F12) în 15 mM tampon HEPES fără roșu fenol sau bicarbonat de sodiu. Bicarbonatul de sodiu este adăugat ca tampon, a se vedea anexa II la raportul de validare (4).

**Mediu de completare** înseamnă mediu de stoc plus BD Nu-Serum și amestec premium ITS+, a se vedea anexa II la raportul de validare (4).

**Steroidogeneză** înseamnă mecanismul de sinteză care conduce de la colesterol la diferiți hormoni steroizi. Mai mulți intermediari din mecanismul de sinteză a steroizilor, cum ar fi progesteron și testosteron, sunt hormoni importanți în sine, dar sunt, de asemenea, precursori pentru hormoni ulteriori în mecanismul de sinteză.

**T** reprezintă testosteronul, unul dintre cei doi androgeni mai importanți din sistemele mamiferelor.

**Substanță chimică de testat** înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

**Placă de test** înseamnă placa pe care celulele H295R sunt expuse la substanțe chimice de testat. Plăcile de testare cuprind marțorul pentru solvent și substanța chimică de testat la șapte niveluri de concentrație, în trei exemplare.

**Tripsină 1X** înseamnă o soluție diluată a enzimei tripsină, o serin-protează pancreatică, utilizată pentru a desprinde celulele de pe o placă de cultură de celule, a se vedea apendicele III la raportul de validare (4).

## ▼ M5

**B.58. TESTE DE MUTAȚIE GENETICĂ PRIVIND CELULELE GERMINALE ȘI SOMATICE LA ROZĂTOARE TRANSGENICE****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 488 (2013). Metodele de testare UE sunt disponibile pentru o gamă largă de teste de mutație *in vitro* care sunt în măsură să detecteze mutații genetice și/sau cromozomiale. Există metode de testare pentru parametri *in vivo* (de exemplu, aberații cromozomiale și sinteza neprogramată a ADN-ului); totuși, acestea nu măsoară mutațiile genetice. Testele de mutație la rozătoare transgenice (RTG) răspund nevoii de teste *in vivo* practice și disponibile pe scară largă pentru mutații genetice.
2. Testele de mutație RTG au fost examinate pe larg (24) (33). Acestea utilizează șobolani și șoareci transgenici care prezintă mai multe copii de plasmidă integrată cromozomial sau vectori de navetă. Transgenele conțin gene reporter pentru detectarea diferitelor tipuri de mutații induse *in vivo* cu ajutorul substanțelor chimice de testat.
3. Mutațiile care apar la un rozător sunt marcate prin recuperarea transgenă și analizarea fenotipului genei reporter într-o gazdă bacteriană care nu prezintă gena reporter. Testele de mutație genică RTG măsoară mutațiile induse în gene neutre din punct de vedere genetic recuperate din aproape orice țesut al rozătoarelor. Prin urmare, astfel de teste ocolesc multe dintre limitările existente asociate cu studiul *in vivo* al mutației genetice în gene endogene (de exemplu, țesuturi limitate adecvate pentru analize, selecție negativă/pozitivă față de mutații).
4. Datele existente sugerează că transgenele răspund la mutageni într-un mod similar cu genele endogene, în special în ceea ce privește detectarea substituițiilor de perechi de baze, a mutațiilor de secvențe și a unor mici deleții și inserții (24).
5. Atelierele de lucru internaționale privind testarea genotoxicității (IWGT) au aprobat includerea testelor de mutație genică RTG pentru detectarea *in vivo* a mutațiilor genetice și au recomandat un protocol de punere în aplicare a acestora (15) (29). Prezenta metodă de testare se bazează pe recomandările respective. Analizele ulterioare în sprijinul utilizării prezentului protocol pot fi consultate la nota (16).
6. Se estimează că, în viitor, ar putea fi posibil să se combine un test de mutație genică RTG cu un studiu de toxicitate cu doze repetate (capitolul B.57 din prezenta anexă). Cu toate acestea, sunt necesare date pentru a se asigura că sensibilitatea testelor de mutație genică RTG nu este afectată de perioada mai scurtă cu o zi dintre sfârșitul perioadei de administrare și data eșantionării, astfel cum este utilizată în studiul de toxicologie cu doze repetate, față de perioada 3 de zile utilizată în testele de mutație genică RTG. De asemenea, sunt necesare date pentru a indica faptul că performanța testului cu doze repetate nu este afectată negativ de utilizarea unei sușe de rozătoare transgenice, mai degrabă decât sușele de rozătoare tradiționale. Atunci când astfel de date vor fi disponibile, metoda de testare va fi actualizată.
7. Definițiile principalilor termeni sunt prevăzute în apendice.



## ▼ M5

## CONSIDERAȚII INIȚIALE

8. Testele de mutație genică RTG pentru care sunt disponibile date suficiente pentru a sprijini utilizarea acestora în prezenta metodă de testare sunt: șoarecele bacteriofag *lacZ* (Muta<sup>TM</sup>Mouse); șoarecele plasmidic *lacZ*; șoarecele și șobolanul *gpt* delta (*gpt* și *Spi*<sup>-</sup>); șoarecele și șobolanul *lacI* (Big Blue®), astfel cum este efectuat în condiții standard. În plus, testul de selecție pozitivă *cII* se poate utiliza pentru evaluarea mutațiilor în modelele Big Blue® și Muta<sup>TM</sup>Mouse. Mutageneza în modelele RTG este evaluată în mod normal ca frecvență a genelor mutante; cu toate acestea, dacă este necesar, analiza moleculară a mutațiilor poate furniza informații suplimentare (a se vedea punctul 24).
9. Testele de mutații genetice *in vivo* la rozătoare sunt deosebit de relevante pentru evaluarea riscului mutagen, întrucât răspunsurile testelor sunt dependente de metabolismul, farmacocinetica, procesele de reparare a ADN-ului și sinteza ADN-ului prin transleziune *in vivo*, deși acești parametri pot să varieze între specii, între țesuturi și între tipuri de daune asupra ADN-ului. Un test *in vivo* pentru mutații genetice este util pentru studierea ulterioară a unui efect mutagen detectat printr-un sistem *in vitro* și pentru urmărirea rezultatelor testelor utilizând alți parametri *in vivo* (24). Pe lângă faptul că este asociată cauzal cu inducerea cancerului, mutația genică este un parametru relevant pentru predicția bolilor necanceroase pe bază de mutații la nivelul țesuturilor somatice (12) (13), precum și a bolilor cu transmitere pe linia germinală.
10. Dacă există dovezi că substanța de testat, sau un metabolit relevant, nu va afecta niciunul dintre țesuturile de interes, nu este necesar să se efectueze un test de mutație genică RTG.

## PRINCIPIUL TESTULUI

11. În testele descrise la punctul 8, gena țintă este de origine bacteriană sau bacteriofagă, iar mijloacele de recuperare din ADN-ul genomic al rozătoarelor sunt prin incorporarea transgenei într-un bacteriofag  $\lambda$  sau un vector de transfer plasmidic. Procedura implică extracția de ADN genomic din țesutul de interes al rozătoarelor, prelucrarea *in vitro* a ADN-ului genomic (și anume, asamblarea de vectori  $\lambda$  sau ligarea și electroporarea plasmidelor pentru a recupera vectorul de transfer) și detectarea ulterioară a mutațiilor în gazde bacteriene în condiții adecvate. Testele utilizează transgene neutre, care sunt ușor de recuperat din cele mai multe țesuturi.
12. Experimentul de mutație genică RTG de bază implică tratarea rozătoarelor cu o substanță chimică pentru o perioadă de timp. Substanțele chimice pot fi administrate pe orice cale adecvată, inclusiv implantare (de exemplu, testarea unui dispozitiv medical). Perioada totală în care un animal este tratat este numită perioadă de administrare. Administrarea este urmată, de regulă, de o perioadă de timp înainte de sacrificare în care nu se administrează substanțe chimice și în timpul căreia leziunile ADN nereparate sunt fixate în mutații stabile. În literatura de specialitate, această perioadă a fost numită în diferite surse fie timp de manifestare, fie timp de fixare sau timp de exprimare; sfârșitul acestei perioade este momentul eșantionării (15) (29). După ce animalul este sacrificat, ADN-ul genomic este izolat din țesutul/țesuturile de interes și purificat.

## ▼ M5

13. De regulă, se colectează date pentru un singur țesut pentru fiecare animal din asamblări/ligări multiple, iar frecvența mutantului se evaluează, în general, utilizând un total cuprins între  $10^5$  și  $10^7$  unități formatoare de plăci sau unități formatoare de colonii. Atunci când se utilizează metode de selecție pozitive, unitățile formatoare de plăci totale se determină cu un set separat de plăci neselective.
14. S-au dezvoltat metode de selecție pozitive pentru a facilita detectarea mutațiilor atât în gena *gpt* [șoarece și șobolan *gpt* delta, fenotip *gpt*<sup>-</sup> (20) (22) (28)], cât și în gena *lacZ* [Muta<sup>TM</sup>Mouse sau șoarece plasmidic *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; dimpotrivă, mutațiile genetice *lacI* la animale Big Blue® sunt detectate utilizând o metodă neselectivă care identifică genele mutante prin generarea de plăci colorate (albastre). Metodologia de selecție pozitivă se aplică, de asemenea, pentru a detecta mutații punctuale care apar în gena *cII* a vectorului de transfer bacteriofag  $\lambda$  [șoarece sau șobolan Big Blue® și Muta<sup>TM</sup>Mouse (17)] și mutațiile de ștergere în genele  $\lambda$  *red* și *gam* [selecție Spi<sup>-</sup> la șoarece și șobolan *gpt* delta (21) (22) (28)]. Frecvența genelor mutante se calculează prin împărțirea numărului de plachete/plasmide care conțin mutații în transgenă la numărul total de plachete/plasmide recuperate din aceeași probă de ADN. În studiile de mutație genică RTG, frecvența genelor mutante este parametrul raportat. În plus, frecvența mutației se poate determina, de asemenea, ca fracțiunea celulelor care prezintă mutații independente; calculul necesită corecție pentru expansiunea clonală prin secvențierea genelor mutante recuperate (24).
15. Mutațiile marcate în testele de punct de mutație *lacI*, *lacZ*, *cII* și *gpt* constau, în principal, în mutații de substituție a perechilor de bază, mutații de secvențe și mici inserții/deleții. Proportia relativă a acestor tipuri de mutație în cadrul mutațiilor spontane este similară cu cea observată la gena Hprt endogenă. Deleții mari sunt detectate numai cu selecția Spi<sup>-</sup> și în testele de plasmide *lacZ* (24). Mutațiile de interes sunt mutații *in vivo* care apar la șoarece sau la șobolan. Mutațiile *in vitro* și *ex vivo* care pot apărea în timpul recuperării, al replicării sau al reparării fage/plasmidice sunt relativ rare, iar în unele sisteme acestea pot fi identificate în mod specific sau pot fi excluse de sistemul de selecție gazdă/pozitiv bacterian.

## DESCRIEREA METODEI

**Preparate***Selectarea speciilor de animale*

16. În prezent sunt disponibile o varietate de modele de detectare a mutațiilor genetice la șoareci transgenici, iar astfel de sisteme au fost utilizate pe scară mai largă decât modelele care utilizează șobolani transgenici. În cazul în care șobolanul este în mod clar un model mai adecvat decât șoarecele (de exemplu, atunci când se studiază mecanismul carcinogenezei pentru o tumoră observată doar la șobolani, pentru corelarea cu un studiu de toxicitate pe șobolan sau dacă se știe că metabolismul șobolanului este mai reprezentativ pentru metabolismul uman), trebuie să se ia în considerare utilizarea modelelor cu șobolani transgenici.

*Condiții de adăpost și de hrănire*

17. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C ( $\pm$  3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția perioadelor de curățare a sălii, obiectivul ar fi menținerea unei umidități relative de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, cu o alternanță zilnică de 12 ore de lumină, urmate de 12 de ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de

▼ **M5**

apă potabilă. Alegerea tipului de hrană poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al substanței de testat, atunci când aceasta se administrează pe această cale. Animalele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează un comportament agresiv. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

*Pregătirea animalelor*

18. Animale adulte, mature sexual, tinere și sănătoase (cu vârsta de 8-12 săptămâni la începutul tratamentului) sunt repartizate aleatoriu în grupurile de control și de tratament. Animalele sunt identificate individual. Animalele sunt aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin cinci zile. Cuștile trebuie aranjate astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. La începutul studiului, variația greutatei animalelor ar trebui să fie minimă și să nu depășească  $\pm 20\%$  din greutatea medie a fiecărui sex.

*Prepararea dozelor*

19. Substanțele chimice de testat în stare solidă trebuie dizolvate sau suspendate în solvenții sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în formă lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Se utilizează preparate proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării.

**Condiții de testare***Solvent/vehicul*

20. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Dacă se utilizează alți solvenți/vehiculi decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să le demonstreze compatibilitatea. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi un solvent/vehicul apos.

*Martorii pozitivi*

21. În mod normal, trebuie să se utilizeze animale martori pozitivi concomitenți. Cu toate acestea, pentru laboratoarele care au demonstrat competență (a se vedea punctul 23) și care utilizează în mod obișnuit testele, ADN-ul de la animale tratate care au fost anterior martori pozitivi poate fi inclus în fiecare studiu pentru a confirma succesul metodei. ADN-ul de la experimentele anterioare trebuie să fie obținut de la aceleași specii și țesuturi de interes și să fie depozitat adecvat (a se vedea punctul 36). Atunci când se utilizează martori pozitivi concomitenți, nu este necesară administrarea pe aceeași cale ca și substanța de testat; cu toate acestea, controalele pozitive trebuie să fie cunoscute ca inducând mutații în unul sau mai multe țesuturi de interes pentru substanța de testat. Dozele de substanțe chimice martori pozitivi trebuie selectate astfel încât să producă efecte slabe sau moderate, care evaluează critic performanța și sensibilitatea testului. Exemple de substanțe chimice martori pozitivi și unele dintre țesuturile țintă pentru acestea sunt incluse în tabelul 1.

## ▼ M5

Tabelul 1

## Exemple de substanțele martor pozitive și unele țesuturi țintă

| Substanța chimică utilizată ca martor pozitiv și nr. CAS | Denumire Eines și nr. Eines              | Caracteristici   | Mutație țesut țintă |   |
|--|--|--|---------------------|---|
|  |  |  | Șobolan             | Șoarece   |
| N-etil-N-nitrozouree<br>[CAS nr. 759-73-9]               | N-etil-N-nitrozouree<br>[212-072-2]      | Mutagen cu acțiune directă   | Ficat, plămân       | Măduva osoasă, colon, epiteliul colonului, intestin, plămân, ficat, splină, rinichi, celule granuloase ovariene, celule germinale masculine |
| Carbamat de etil (uretan)<br>[CAS nr. 51-79-6]           | Uretan<br>[200-123-1]                    | Mutagen, necesită metabolism, dar produce doar efecte slabe                  |                     | Măduva osoasă, pre-tomac, intestin subțire, plămân, ficat, splină   |
| 2,4-Diaminotoluen<br>[CAS nr. 95-80-7]                   | 4-metil-m-fenilen-diamină<br>[202-453-1] | Mutagen, necesită metabolism, de asemenea pozitiv în testul Spi <sup>+</sup> | Ficat               | Ficat   |
| Benzo[a]piren<br>[CAS nr. 50-32-8]                       | Benzo[def]crizen<br>[200-028-5]          | Mutagen, necesită metabolism   | Ficat, omenta,      | Măduva osoasă, sân, colon, pre-tomac, stomac glandular, inimă, ficat, plămân, celule germinale masculine                                    |

## Martorii negativi

22. Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile tratate, trebuie să fie incluși la fiecare prelevare de probe. În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene, martori netratați trebuie să fie, de asemenea, incluși pentru fiecare prelevare de probe, pentru a stabili acceptabilitatea martorilor pentru vehicul.

## Verificarea competenței laboratorului

23. Competența în astfel de teste se stabilește prin demonstrarea capacității de a reproduce rezultatele preconizate din datele publicate (24) pentru: 1. frecvențele genelor mutante cu substanțe chimice utilizate ca martori pozitivi (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, nonmutageni și martori pentru vehicul; și 2. recuperarea transgenică din ADN genomic (de exemplu, eficiența de asamblare).

## Secvențierea genelor mutante

24. Pentru aplicații de reglementare, nu este necesară secvențierea ADN a genelor mutante, în special în cazul în care se obține un rezultat pozitiv sau negativ clar. Cu toate acestea, datele de secvențiere pot fi utile atunci când se observă o variabilitate ridicată între indivizi. În aceste cazuri, secvențierea poate fi utilizată pentru a exclude posibilitatea de jackpot-uri sau evenimente clonale prin identificarea proporției de gene mutante unice dintr-un anumit țesut. Secvențierea a aproximativ 10 gene mutante pe țesut

▼ **M5**

pentru fiecare animal ar trebui să fie suficientă pentru a determina pur și simplu dacă genele mutante clonale contribuie la frecvența genelor mutante; pentru corectarea matematică a frecvenței mutante pentru clonalitate, ar putea fi necesară secvențierea a nu mai puțin de 25 de gene mutante. De asemenea, se poate lua în considerare secvențierea genelor mutante atunci când se constată creșteri mici ale frecvenței mutante (de exemplu, aceasta depășește cu puțin valorile martorilor netratate). Diferențele în spectrul mutant între coloniile mutante de la animalele tratate și netratate pot sprijini constatarea unui efect mutagen (29). De asemenea, spectrele de mutație pot fi utile pentru dezvoltarea de ipoteze mecaniciste. În cazul în care secvențierea trebuie să fie inclusă ca parte a protocolului de studiu, trebuie să se acorde o atenție deosebită conceperii unor astfel de studii, în special în ceea ce privește numărul de gene mutante secvențiate pe eșantion, pentru a obține puterea adecvată în funcție de modelul statistic (a se vedea punctul 43).

**PROCEDURĂ****Numărul și sexul animalelor**

25. Numărul de animale pe grup trebuie predeterminat astfel încât să fie suficient pentru a furniza puterea statistică necesară pentru a detecta cel puțin o dublare a frecvenței mutante. Grupurile vor fi alcătuite din cel puțin cinci animale; cu toate acestea, dacă puterea statistică este insuficientă, ar trebui să se crească numărul de animale în funcție de necesități. În mod normal se utilizează masculi. Pot exista cazuri în care ar fi justificată testarea doar pe femele, de exemplu, atunci când se testează medicamente de uz uman pentru femei sau când se studiază metabolismul specific feminin. În cazul în care există diferențe semnificative între sexe în ceea ce privește toxicitatea sau metabolismul, vor fi necesari atât masculi, cât și femele.

**Perioadă de administrare**

26. Pe baza observațiilor conform cărora mutațiile se acumulează cu fiecare tratament, este necesar un regim de doze repetate, cu tratamente zilnice, pentru o perioadă de 28 de zile. Aceasta perioadă este considerată, în general, acceptabilă atât pentru producerea unei acumulări suficiente de mutații produse de mutageni slabi, cât și pentru a acorda un timp adecvat de expunere pentru detectarea mutațiilor în organele care proliferază lent. Pentru anumite evaluări, pot fi adecvate regimuri alternative de tratament, iar schemele alternative de administrare trebuie să fie justificate în mod științific în protocol. Tratamentele nu trebuie să fie mai scurte decât timpul necesar pentru inducerea completă a tuturor enzimelor metabolizatoare relevante, iar tratamentele mai scurte pot necesita utilizarea mai multor momente de prelevare a probelor, care sunt potrivite pentru organe cu diferite rate de proliferare. În orice caz, trebuie să se utilizeze toate informațiile disponibile (de exemplu, cu privire la toxicitatea generală sau metabolism și farmacocinetică) atunci când se justifică un protocol, în special atunci când există abateri de la recomandările standard de mai sus. Deși ar putea ameliora sensibilitatea, durata de tratament mai lungă de opt săptămâni trebuie să fie explicată în mod clar și justificată, întrucât duratele lungi de tratament pot produce o creștere evidentă în frecvența a genelor mutante prin expansiune clonală (29).

**Doze**

27. Nivelurile dozelor trebuie să se bazeze pe rezultatele unui studiu de stabilire a nivelurilor de doză care măsoară toxicitatea generală, realizat utilizând aceeași cale de expunere, sau pe baza rezultatelor studiilor anterioare de toxicitate sub-acute. Pentru determinarea nivelurilor de doză, se pot utiliza animale non-transgenice din aceeași sușă de rozătoare. În testul principal, pentru a obține informații de răspuns la doză, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ (a se vedea punctul 22) și cel puțin trei niveluri de dozare distanțate corespunzător, cu excepția cazului în care s-a

▼ **M5**

utilizat doza limită (a se vedea punctul 28). Doza maximă trebuie să fie doza maximă tolerată (DMT). DMT este definită ca doza care produce semne de toxicitate astfel încât se preconizează că doze mai mari, administrate în același regim de dozare, ar fi letale. Substanțele chimice cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturare de proprietăți toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și trebuie să fie evaluate de la caz la caz. Dozele utilizate trebuie să acopere un interval de la toxicitate maximă la toxicitate mică sau absența oricărei toxicități.

**Test limită**

28. În cazul în care experimentele de stabilire a nivelurilor de doză sau datele existente de la speciile de rozătoare conexe indică faptul că un regim de tratament cu cel puțin doza limită (a se vedea mai jos) nu produce efecte toxice detectabile și dacă nu s-ar preconiza genotoxicitate pe baza datelor de la substanțe chimice înrudite structural, atunci un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite ar putea să nu fie considerat necesar. Pentru o perioadă de administrare de 28 de zile (de exemplu, 28 de tratamente zilnice), doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru perioade de administrare de 14 zile sau mai puțin, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi (regimurile de dozare care diferă de 28 de tratamente zilnice trebuie să fie justificate în mod științific în protocol, a se vedea punctul 26).

**Administrarea dozelor**

29. Substanța de testat se administrează, de regulă, prin gavaj cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adecvate. În general, la conceperea unui test trebuie să se ia în considerare calea anticipată de expunere a omului. Prin urmare, se pot accepta alte căi de expunere (cum ar fi în apa potabilă, subcutanat, intravenos, local, prin inhalare, intratraheal, în hrană sau implantare), în cazul în care acestea pot fi justificate. Injectarea intraperitoneală nu este recomandată deoarece aceasta nu este o cale fiziologică relevantă de expunere a omului. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 2 ml/100g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât acesta trebuie să fie justificată. Cu excepția substanțelor chimice iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat trebuie să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant pentru toate dozele.

**Timpul de eșantionare***Celulele somatice*

30. Timpul de eșantionare este o variabilă esențială deoarece este determinată de perioada necesară pentru fixarea mutațiilor. Această perioadă este specifică țesutului și pare să fie legată de timpul de reînnoire al populației de celule, măduva osoasă și intestinul având răspuns rapid, iar ficatul fiind mult mai lent. Un compromis adecvat pentru măsurarea frecvențelor mutante în țesuturile cu proliferare rapidă și lentă este de 28 de tratamente zilnice consecutive (astfel cum este indicat la punctul 26) și prelevarea de probe la trei zile după tratamentul final, deși, în aceste condiții, frecvența maximă a genelor mutante ar putea să nu se manifeste în țesuturile cu proliferare lentă. În cazul în care țesuturile cu proliferare lentă sunt deosebit de importante, atunci ar putea fi mai adecvată o prelevare ulterioară la 28 de zile după perioada de administrare de 28 zile (16) (29). În astfel de cazuri, prelevarea ulterioară va înlocui prelevarea la 3 zile și ar necesita o justificare științifică.

▼ **M5***Celulele germinale*

31. Testele RTG sunt adecvate studiului de inducție de mutații genetice pe celule germinale masculine (7) (8) (27), în care calendarul și cinetica spermatogenezei au fost bine definite (27). Numerele scăzut de ovule disponibile pentru analiză, inclusiv după super-ovulație și faptul că nu există o sinteză ADN în ovocit împiedică determinarea mutației în celulele germinale feminine utilizând teste transgenice (31).
  
32. Timpii de prelevare a probelor de celule germinale masculine ar trebui să fie selectați astfel încât să se eșantioneze gama de tipuri de celule expuse de-a lungul dezvoltării celulelor germinale, iar etapa vizată în prelevarea de probe să fi primit expunere suficientă. Timpul necesar pentru progresia celulelor germinale în dezvoltare de la celule stem spermatogoniale la spermă matură care ajunge în vasele deferente/epididimul caudal este de ~ 49 de zile pentru șoarece (36) și ~ 70 zile de la șobolan (34) (35). După o expunere de 28 de zile, cu o perioadă ulterioară de eșantionare de trei zile, sperma acumulată colectată din vasele deferente/epididimul caudal (7) (8) va reprezenta o populație de celule expuse pe parcursul a aproximativ celei de-a doua jumătăți a spermatogenezei, care include perioada meiotică și perioada postmeiotică, dar nu și perioada spermatogonială sau a celulei stem. Pentru a preleva în mod adecvat celule din vasele deferente/epididimul caudal care erau celule stem spermatogoniale în timpul perioadei de expunere, este necesar un timp de eșantionare suplimentar de cel puțin 7 săptămâni (șoareci) sau 10 săptămâni (șobolan) după terminarea tratamentului.
  
33. Celulele extrudate din tubii seminiferi după un regim de 28 + 3 zile cuprind o populație mixtă îmbogățită pentru toate etapele de dezvoltare a celulelor germinale (7) (8). Prelevarea celulelor respective pentru detectarea mutațiilor genetice nu oferă o evaluare la fel de precisă a etapelor în care sunt induse mutațiile celulelor germinale în comparație cu cele care pot fi obținute de la prelevarea de probe de spermatozoizi din vasele deferente/epididimul caudal (deoarece există o serie de tipuri de celule germinale prelevate de la nivelul tubilor și vor exista unele celule somatice care contaminatează populația de celule). Cu toate acestea, prelevarea de probe de celule din tubii seminiferi pe lângă spermatozoizii din vasele deferente/epididimul caudal în urma doar a unui regim de eșantionare de 28 + 3 zile ar asigura o oarecare acoperire a celulelor expuse pe parcursul majorității fazelor de dezvoltare a celulelor germinale și poate fi utilă pentru detectarea unor mutageni ai celulelor embrionare.

**Observații**

34. Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie efectuate cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Starea de sănătate a animalelor trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe zi, toate animalele sunt examinate pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână și la sacrificare. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut, consumul de apă trebuie măsurat la fiecare schimbare a apei și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă trebuie să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (23).



## ▼ M5

**Colectarea de țesuturi**

35. Justificarea pentru colectarea de țesuturi trebuie să fie clar definită. Întrucât este posibil să se studieze inducția mutației în aproape orice țesut, selecția țesuturilor colectate trebuie să se bazeze pe motivul pentru efectuarea studiului și pe orice date existente privind mutagenitatea, carcinogenitatea sau toxicitatea pentru substanța chimică care face obiectul studiului. Factorii importanți de luat în considerare trebuie să includă calea de administrare (pe baza căii/căilor de expunere probabilă/probabile la om), distribuția preconizată în țesuturi și eventuale mecanisme de acțiune. În absența oricăror informații de context, ar trebui să se colecteze mai multe țesuturi somatice, după cum pot fi de interes. Acestea ar trebui să reprezinte țesuturi cu proliferare rapidă, țesuturi cu proliferare lentă și țesuturi de la locul de contact. În plus, spermatozoizii din vasele deferente/epididimul caudal și celulele germinale în curs de dezvoltarea din tubii seminiferi (conform descrierii de la punctele 32 și 33) ar trebui să fie colectați și stocați în cazul în care ar putea fi necesară o viitoare analiză privind mutagenitatea celulelor germinale. Trebuie să se consemneze greutatea organelor, iar pentru organele mari, trebuie să se realizeze prelevări din aceeași zonă de la toate animalele.

**Stocarea țesuturilor și a ADN-ului**

36. Țesuturile (sau omogenatele tisulare) trebuie să fie păstrate la temperaturi sub – 70 °C și să fie utilizate pentru izolarea ADN-ului în termen de 5 ani. ADN-ul izolat, păstrat în frigider la 4 °C în tampon adecvat, ar trebui să fie utilizat în mod optim pentru analiza mutației în termen de 1 an.

**Selecția țesuturilor pentru analiza genelor mutante**

37. Alegerea țesuturilor trebuie să se bazeze pe considerente precum: 1. calea de administrare sau locul primului contact (de exemplu, stomacul glandular, în cazul administrării orale, plămânul în cazul administrării prin inhalare sau pielea în cazul aplicării topice); și 2. parametrii farmacocinetici observați în studiile de toxicitate generală, care indică dispunerea, reținerea sau acumularea țesutului sau organelor țintă pentru toxicitate. În cazul în care studiile sunt realizate pentru a urmări studiile de carcinogenitate, trebuie să se ia în considerare țesuturile țintă pentru carcinogenitatea. Alegerea țesuturilor pentru analiză ar trebui să maximizeze detectarea substanțelor chimice care sunt mutageni cu acțiune directă *in vitro*, metabolizați rapid, foarte reactivi sau slab absorbiți sau pentru care țesutul țintă este determinat de calea de administrare (6).
38. În absența unor informații de bază și luând în considerare locul de contact datorat căii de administrare, ficatul și cel puțin un țesut cu divizare rapidă (de exemplu, stomacul glandular, măduva osoasă), trebuie să fie evaluate pentru mutagenitate. În cele mai multe cazuri, cerințele de mai sus pot fi îndeplinite prin analizarea a două țesuturi atent selectate, dar în unele cazuri ar putea fi necesare trei sau mai multe țesuturi. În cazul în care există motive de preocupare specifică privind efectele asupra celulelor germinale, inclusiv răspunsuri pozitive în celulele somatice, trebuie să se evalueze țesuturile celulelor germinale pentru determinarea mutațiilor.

**Metode de măsurare**

39. Metodele standard de laborator sau metodele publicate pentru detectarea genelor mutante sunt disponibile pentru modelele transgenice recomandate: bacteriofag și plasmidă lambda *lacZ* (30); șoarece *lacI* (2) (18); șoarece delta *gpt* (22); șobolan delta *gpt* (28); *cII* (17). Modificările trebuie să fie justificate și documentate în mod corespunzător. Date din mai multe asamblări pot fi agregate și utilizate pentru a ajunge la un număr adecvat de plăci sau colonii. Cu toate acestea, necesitatea unui număr mare de reacții de asamblare pentru a ajunge la numărul adecvat de plachete poate fi un indiciu de ADN de proastă calitate. În astfel de cazuri, datele trebuie să fie luate în considerare cu atenție deoarece acestea ar putea să nu fie fiabile. Numărul total optim de plachete sau colonii per probă de ADN este



▼ **M5**

guvernat de probabilitatea statistică de detectare a unui număr suficient de gene mutante, la o anumită frecvență spontană a genelor mutante. În general, sunt necesare cel puțin 125 000 — 300 000 de plachete dacă frecvența spontană a genelor mutante este de ordinul a  $3 \times 10^{-5}$  (15). Pentru testul Big Blue® *lacI*, este important să se demonstreze că întreaga serie de fenotipuri mutante de culoare poate fi detectată prin includerea unor martori corespunzători de culoare în același timp cu fiecare alcătuire de plăci. Țesuturile și probele rezultate (elemente) trebuie prelucrate și analizate utilizând un concept bloc, în care elemente de la grupul martor pentru vehicul/solvent, grupul martor pozitiv (dacă este utilizat) sau ADN martor pozitiv (dacă este cazul) și fiecare grup de tratament sunt prelucrate împreună.

**DATE ȘI RAPORT****Prelucrarea rezultatelor**

40. Datele pentru fiecare animal trebuie să fie prezentate sub formă de tabel. Unitatea experimentală este animalul. Raportul trebuie să includă numărul total de unități formatoare de plăci (ufp) sau unități formatoare de colonii (ufc), numărul de gene mutante și frecvența genelor mutante pentru fiecare țesut de la fiecare animal. În cazul în care există mai multe reacții de asamblare/salvare, trebuie să se raporteze numărul de reacții per probă de ADN. Deși trebuie să se păstreze datele pentru fiecare reacție în parte, trebuie să se raporteze doar valorile totale ale ufp sau ufc. Trebuie să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 34. Orice rezultate de secvențiere trebuie să fie prezentate pentru fiecare mutant analizat și trebuie să se arate calculele de frecvență a mutației care rezultă pentru fiecare animal și țesut.

**Evaluarea și interpretarea rezultatelor statistice**

41. Există o serie de criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, cum ar fi o creștere dependentă de doză a frecvenței mutante sau o creștere clară a frecvenței mutante într-un singur grup de doză în comparație cu grupul martor pentru solvent/vehicul. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri de doze tratate. În timp ce relevanța biologică a rezultatelor trebuie să fie considerată primordială, se pot utiliza metode statistice adecvate ca instrument în evaluarea rezultatelor testelor (4) (14) (15) (25) (26). Testele statistice utilizate trebuie să ia în considerare animalul ca unitate experimentală.
42. O substanță chimică de testat pentru care rezultatele nu îndeplinesc criteriile de mai sus, în orice tip de țesut, este considerată nemutagenă în cadrul testului. Pentru relevanța biologică a unui rezultat negativ, trebuie confirmată expunerea țesutului.
43. Pentru analizele de secvențiere a ADN-ului, sunt disponibile o serie de abordări statistice pentru a contribui la interpretarea rezultatelor (1) (5) (9) (19).
44. Analizarea faptului dacă valorile observate se situează în interiorul sau în afara intervalului martor istoric poate oferi orientare în evaluarea semnificației biologice a răspunsului (32).

**▼ M5****Raportul de testare**

45. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

*Substanța chimică de testat:*

- date de identificare și nr. CAS, dacă se cunosc;
- sursa, numărul lotului, dacă sunt disponibile;
- natura fizică și puritatea;
- proprietățile fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului;
- stabilitatea substanței de testat, dacă se cunoaște.

*Solvent/vehicul:*

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;
- prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau inhalărilor;
- determinările analitice asupra formulărilor (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale).

*Animale de laborator:*

- specia/sușa utilizată și o justificare pentru alegerea acestora;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, hrana etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

*Condiții de testare:*

- datele privind martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul de stabilire a intervalului dozelor;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea căii de administrare alese;
- metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

**▼ M5**

- doză efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apă potabilă și consum, dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea detaliată a regimului de dozare și a metodelor de eșantionare și justificările pentru alegerile făcute;
- metoda de eutanasiere;
- metodele de izolare și conservare a țesuturilor;
- metodele de izolare a ADN-ului genomic la rozătoare, salvarea transgenei din ADN-ul genomic și transferul ADN-ului transgenic la o gazdă bacteriană;
- sursa și numărul lotului pentru toate celulele, trusele și reactivii (după caz);
- metodele de numărare de mutațiilor;
- metodele de analiză moleculară a mutațiilor și utilizarea acestora în corectarea clonalității și/sau calcularea frecvențelor mutațiilor, dacă este cazul.

*Rezultate:*

- starea animalelor înaintea și pe întreaga durată a testului, inclusiv simptomele de toxicitate;
- valorile greutății corporale și a organelor la sacrificare;
- pentru fiecare țesut/animal, numărul genelor mutante, numărul de plăci sau colonii evaluate, frecvența genelor mutante;
- pentru fiecare țesut/grup de animale, numărul de reacții de asamblare pe probă de ADN, numărul total de gene mutante, frecvența medie a genelor mutante, deviația standard;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- pentru fiecare țesut/animal, numărul de gene mutante independente și frecvența medie a mutațiilor, în cazul în care a fost efectuată analiza moleculară a mutațiilor;
- date concomitente și date istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii și deviații standard;
- date concomitente privind martorii pozitivi (sau date neconcomitente privind martorii pozitivi ADN);
- determinări analitice, în cazul în care sunt disponibile (de exemplu, concentrațiile de ADN utilizate în asamblare, date privind secvențierea ADN-ului);
- analizele statistice și metodele aplicate.

*Discutarea rezultatelor**Concluzii*

## ▼ M5

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra, *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement, *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations *Nature*, 377(6550): 657-659.
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice, *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency, *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens, *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.
- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells, *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), Bayesian Analysis of Mutational Spectra, *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), A Selective System for *lacZ*-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host, *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer, *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update, *Mutation Res.*, 705: 96-106.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), *In vivo* Transgenic Mutation Assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

## ▼M5

- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage  $\lambda$  Transgene Target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing, *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis, *Carcinogenesis*, 29(4): 772778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using  $\text{Spi}^-$  and 6-thioguanine Selections, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999),  $\text{Spi}^-$  Selection: an Efficient Method to Detect  $\gamma$ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays, *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), Study Design and Sample Sizes for a *lacI* Transgenic Mouse Mutation Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), Sources of Variability in Data from a Positive Selection *lacZ* Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study, *Mutation. Res.*, 388(2-3): 249-289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays, *Mutation. Res.*, 598: 164-193.
- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers, *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
- (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), *In vivo* Transgenic Mutation Assays, *Mutation Res.*, 540: 141-151.
- (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), Bacteriophage  $\lambda$  and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.

▼ **M5**

- (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells, *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
- (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
- (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.
- (34) Clermont, Y. (1972), Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), The Epididymis, in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
- (36) Russell, L.B. (2004), Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse, *Genetica*, 122: 25-36.

▼ **M5***Apendice***DEFINIȚII**

**Perioadă de administrare:** perioada totală în care un animal este tratat.

**Substituție pereche de bază:** un tip de mutație care cauzează înlocuirea unei singure baze de nucleotide a ADN-ului cu o altă bază de nucleotide a ADN-ului.

**Capsidă:** învelișul proteic care înconjoară o particulă de virus.

**Substanță chimică:** o substanță sau un amestec de substanțe.

**Expansiune clonală:** producerea de mai multe celule dintr-o singură celulă (mutant).

**Unitate formatoare de colonii (ufc):** o măsură a numărului de bacterii viabile.

**Concatamer:** o biomoleculă continuă lungă compusă din mai multe copii identice legate în serie.

**Sit cos:** un segment de 12 nucleotide de ADN monocatenar care există la ambele capete ale genomului dublu catenar bacteriofag lambda.

**Deleție:** o mutație în care genomul pierde una sau mai multe nucleotide (secvențiale).

**Electroporare:** aplicarea de impulsuri electrice pentru a crește permeabilitatea membranelor celulare.

**Genă endogenă:** o genă nativă genomului.

**Variație extrabinomială:** variabilitate mai mare în estimări repetate a unei părți a populației decât ar fi de așteptat în cazul în care populația ar avea o distribuție binomială.

**Mutație care conduce la decalarea cadrului (frameshift):** o mutație genetică cauzată de inserții sau deleții ale unui număr de nucleotide care nu este divizibil cu trei dintr-o secvență de ADN care codifică o proteină/peptidă.

**Inserție:** adăugarea uneia sau a mai multor perechi de baze de nucleotide într-o secvență de ADN.

**Jackpot:** un număr mare de gene mutante care au apărut prin expansiunea clonală dintr-o singură mutație.

**Deleții mari:** deleții în ADN-ul a mai mult de câteva kilobaze (care sunt detectate în mod eficient cu selecție  $Sp^+$  și testele de plasmide lacZ).

**Ligare:** legarea covalentă a două capete ale moleculelor de ADN utilizând ligaza ADN.

**Mitogen:** o substanță chimică care stimulează o celulă să înceapă diviziunea celulară, declanșând mitoză (și anume, diviziunea celulară).

**Genă neutră:** o genă care nu este afectată de presiuni selective pozitive sau negative.

**Asamblare:** sinteza de particule infecțioase ale unui fag de la un preparat de capsidă a unui fag și proteine de coadă și o concatamer de molecule ADN ale unui fag. Frecvent utilizată pentru a asambla ADN clonat pe un vector lambda (separat de sit-uri cos) în particule lambda infecțioase.

**Eficiență de asamblare:** eficiența cu care bacteriofagii asamblați sunt recuperați în bacterii gazdă.

**▼ M5**

**Unitate formatoare de plăci (ufp):** o măsură a numărului de bacteriofagi viabili.

**Mutație punctuală:** un termen general pentru o mutație care afectează doar o mică secvență de ADN incluzând mici inserții, deleții și substituții de perechi de baze.

**Selecție pozitivă:** o metodă care permite numai genelor mutante să supraviețuiască.

**Genă reporter:** o genă al cărei produs de genă mutantă este ușor de detectat.

**Timp de eșantionare:** sfârșitul perioadei de timp, înainte de sacrificare, în care nu se administrează substanța chimică și în care leziunile ADN neprelucrate sunt fixate în mutații stabile.

**Vector de transfer:** un vector construit astfel încât să se poată propaga în două specii gazdă diferite; în consecință, ADN-ul inserat într-un vector de transfer poate fi testat sau manipulat în două tipuri diferite de celule sau două organisme diferite.

**Substanță chimică de testat:** orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

**Transgenic:** aparținând de, referitor la sau fiind un organism al cărui genom a fost modificat prin transferul unei gene sau al unor gene de la o altă specie.



**▼B****PARTEA C: METODE PENTRU DETERMINAREA ECOTOXICITĂȚII**

## CUPRINS

- C.1. TOXICITATEA ACUTĂ LA PEȘTI
- C.2. *DAPHNIA* SP. TESTUL IMOBILIZĂRII ACUTE
- C.3. ALGE DE APĂ DULCE ȘI CIANOBACTERII, TEST DE INHIBARE A CREȘTERII
- C.4. DETERMINAREA BIODEGRADABILITĂȚII „RAPIDE”
- PARTEA I. CONSIDERAȚII GENERALE
- PARTEA II. TESTUL DE EPUIZARE COD (Metoda C.4-A)
- PARTEA III. TESTUL DE SCREENING MODIFICAT OCDE (Metoda C.4-B)
- PARTEA IV. TESTUL DE DEGAJARE A CO<sub>2</sub> (Metoda C.4-C)
- PARTEA V. TESTUL DE RESPIROMETRIE MANOMETRICĂ (Metoda C.4-D)
- PARTEA VI. TESTUL CU VAS ÎNCHIS (Metoda C.4-E)
- PARTEA VII. TESTUL MITI (METODA C.4-F)
- C.5. DEGRADAREA – CONSUMUL BIOCHIMIC DE OXIGEN
- C.6. DEGRADAREA – CONSUMUL CHIMIC DE OXIGEN
- C.7. DEGRADAREA – DEGRADAREA ABIOTICĂ: HIDROLIZA CA O FUNCȚIE A PH-ULUI
- C.8. TOXICITATEA LA RÂME
- C.9. BIODEGRADARE – METODA ZAHN-WELLENS
- C.10. TEST DE SIMULARE – TRATAREA AEROBĂ A APELOR UZATE: C.10-A: UNITĂȚI CU NĂMOL ACTIV – C.10-B: BIOPELICULE
- C.11. NĂMOL ACTIV, TEST DE INHIBARE A RESPIRAȚIEI (OXIDAREA CARBONULUI ȘI A AMONIULUI)
- C.12. BIODEGRADARE – TESTUL SCAS MODIFICAT
- C.13. BIOCONCENTRAREA: EXPERIENȚA CU REÎNNOIRE CONTINUĂ ASUPRA PEȘTELOR
- C.14. TESTUL DE CREȘTERE A PUIETULUI DE PEȘTE
- C.15. PEȘTII, TESTUL DE TOXICITATE PE TERMEN SCURT ÎN STADIILE DE EMBRION ȘI DE ALEVIN
- C.16. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ
- C.17. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PRIN CONTACT
- C.18. ADSORBȚIA/DESORBȚIA PRINTR-O METODĂ DE STABILIRE A ECHILIBRULUI PROBELOR

**▼B**

- C.19. ESTIMAREA COEFICIENTULUI DE ADSORBȚIE ( $K_{co}$ ) PE SOL ȘI NĂMOL DE EPURARE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)
- C.20. TEST DE REPRODUCERE PENTRU *DAPHNIA MAGNA*
- C.21. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A AZOTULUI
- C.22. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A CARBONULUI
- C.23. TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SOL
- C.24. TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SISTEMELE DE SEDIMENTE ACVATICE
- C.25. MINERALIZAREA AEROBĂ ÎN APA DE SUPRAFAȚĂ – TEST DE SIMULARE A BIODEGRADĂRII
- C.26. TEST DE INHIBARE A CREȘTERII LA SPECIILE DE *LEMNA*
- C.27. TEST DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT
- C.28. TESTUL DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU APĂ ÎMBOGĂȚITĂ
- C.29. BIODEGRADABILITATEA RAPIDĂ –  $CO_2$  ÎN VASE ÎNCHISE ERMETIC (TESTARE ÎN SPAȚIUL LIBER)
- C.30. BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETEELE TERESTRE
- C.31. TEST PE PLANTĂ TERESTRĂ: TEST DE APARIȚIE A PLANTULELOR ȘI DE CREȘTERE A PLANTULELOR
- C.32. TEST DE REPRODUCERE A ENCHITREIDELOR
- C.33. TEST DE REPRODUCERE A RÂMELOR (*EISENIA FETIDA*/*EISENIA ANDREI*)
- C.34. DETERMINAREA INHIBĂRII ACTIVITĂȚII BACTERIILOR ANAEROBE – REDUCEREA PRODUCȚIEI DE GAZE PROVENITE DIN NĂMOL (DE EPURARE) SUPUS PROCESULUI DE DIGESTIE ANAEROBĂ
- C.35. TEST DE TOXICITATE PE *LUMBRICULUS* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT
- C.36. TEST DE REPRODUCERE A UNUI ACARIAN PRĂDĂTOR [*HYPOASPIS* (*GEOLAE LAP*S) *ACULEIFER*] DIN SOL
- C.37. TEST DE 21 DE ZILE PE PEȘTI: SCREENING CU DURATĂ SCURTĂ PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII ESTROGENICE ȘI ANDROGENICE ȘI A INHIBĂRII AROMATAZEI

**▼B**

- C.38. TEST DE METAMORFOZĂ LA AMFIBIENI
- C.39. TEST DE REPRODUCERE A COLEMBOLOR ÎN SOL
- C.40. TEST DE TOXICITATE PE CHIRONOMIDE CARE CUPRINDE CICLUL DE VIAȚĂ DESFĂȘURAT ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT UTILIZÂND APĂ ADIȚIONATĂ SAU SEDIMENT ADIȚIONAT
- C.41. TEST DE DEZVOLTARE SEXUALĂ A PEȘTELOR
- C.42. BIODEGRADABILITATEA ÎN APĂ DE MARE
- C.43. BIODEGRADABILITATEA ANAEROBĂ A SUBSTANȚELOR ORGANICE DIN NĂMOLUL FERMENTAT: PRIN MĂSURAREA PRODUCERII DE GAZE
- C.44. PERCOLARE ÎN COLOANE DE SOL
- C.45. ESTIMAREA EMISIILOR ÎN MEDIU PROVENITE DE LA LEMNUL TRATAT CU PRODUSE DE CONSERVARE: METODĂ DE LABORATOR PENTRU PRODUSELE DIN LEMN CARE NU SUNT ACOPERITE ȘI CARE SUNT ÎN CONTACT CU APĂ DULCE SAU CU APĂ DE MARE
- C.46. BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE BENTICE CARE TRĂIESC ÎN SEDIMENTE



## C.1. TOXICITATEA ACUTĂ LA PEȘTI

### 1. METODĂ

#### 1.1. INTRODUCERE

Scopul testului de față este de a determina toxicitatea letală acută a unei substanțe la peștii de apă dulce. Este de dorit să se colecteze informații legate de solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, stabilitatea chimică, constantele de disociere și biodegradabilitatea substanței, pentru a alege metoda optimă de testare (statică, semistatică sau dinamică) și pentru a asigura concentrații constante satisfăcătoare ale substanței pe durata testării.

Atât la planificarea testului, cât și la interpretarea rezultatelor se iau în considerare informațiile suplimentare (de exemplu formula structurală, gradul de puritate, natura și procentul de impurități semnificative, prezența și cantitatea de aditivi și coeficientul de partiție n-octanol/apă).

#### 1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Toxicitatea acută reprezintă efectul advers vizibil indus într-un organism într-o perioadă scurtă (zile) de expunere la o substanță. În testul de față, toxicitatea acută se exprimă drept concentrația letală mediană ( $CL_{50}$ ), care este acea concentrație a substanței de testat în apă care provoacă moartea a 50 % din lotul de pești de experiență într-o perioadă de expunere continuă și definită.

Toate concentrațiile substanței de testat se exprimă ca greutate pe volum (miligrame pe litru). Ele pot fi, de asemenea, exprimate ca greutate din greutate ( $mg/kg^{-1}$ ).

#### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Se poate testa o substanță de referință pentru a demonstra că în condițiile de testare din laborator răspunsul speciilor testate nu s-a schimbat semnificativ.

Pentru acest test nu sunt specificate substanțe de referință.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se efectuează un test-limită la 100 mg/l pentru a demonstra că  $CL_{50}$  este mai mare decât această concentrație.

Peștii se tratează cu substanța de testat solubilizată în apă, într-o serie de concentrații, pe o perioadă de 96 de ore. Se înregistrează mortalitatea la intervale de cel puțin 24 de ore și se calculează concentrațiile care provoacă moartea a 50 % dintre pești ( $CL_{50}$ ) în fiecare perioadă de observare, dacă este posibil.

#### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Criteriile de calitate se aplică testului-limită, precum și testului complet.

Mortalitatea la martori nu trebuie să depășească 10 % (sau un pește dacă se folosesc mai puțin de zece pești) până la sfârșitul testului.

Concentrația de oxigen dizolvat trebuie să fie mai mare de 60 % din valoarea de saturație în aer, până la sfârșitul testului.

**▼B**

Concentrațiile substanței de testat se mențin în limita a 80 % din concentrațiile inițiale pe toată durata testului.

Pentru substanțele care se dizolvă ușor în mediul de testare, rezultând soluții stabile, respectiv soluții care nu se volatilizează, degradează, hidrolizează sau adsorb într-o măsură considerabilă, concentrația inițială poate fi considerată echivalentă cu concentrația nominală. Trebuie demonstrat că pe toată durata testului au fost menținute aceleași concentrații, iar criteriile de calitate au fost satisfăcute.

Pentru substanțele care sunt:

- (i) puțin solubile în mediul de testare; sau
- (ii) capabile să formeze emulsii stabile ori dispersii; sau
- (iii) instabile în soluții apoase,

concentrația inițială este considerată drept concentrația determinată analitic în soluție (sau, în cazul în care nu este posibil tehnic, măsurată în coloana de apă) la începutul testului. Concentrația se determină după o perioadă de echilibrare, dar înainte de introducerea peștilor de experiență.

În oricare din aceste cazuri, se efectuează determinări suplimentare pe parcursul testului pentru a confirma concentrațiile reale de expunere sau respectarea criteriilor de calitate.

Valoarea pH-ului trebuie să nu varieze cu mai mult de o unitate.

## 1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se pot folosi trei tipuri de metode:

### *Test în regim static:*

Test de toxicitate în care soluția testată nu se înlocuiește (soluțiile rămân nemodificate pe toată durata testului).

### *Test în regim semistatic:*

Test fără înlocuirea continuă a soluției testate, dar cu înlocuirea cu regularitate a întregii soluții (de exemplu la 24 de ore).

### *Test în regim dinamic:*

Test de toxicitate în care soluția testată este reînnoită constant în vasele de testare, substanța de testat fiind transportată cu apa folosită pentru a reînnoi soluția.

## 1.6.1. Reactivi

### 1.6.1.1. Soluțiile substanțelor de testat

Soluțiile mamă în concentrația necesară se prepară prin dizolvarea substanței în apă deionizată sau în apă conform punctului 1.6.1.2.

Concentrațiile de testare alese sunt preparate prin diluarea soluției mamă. Dacă se testează concentrații ridicate, cantitățile corespunzătoare din substanța de testat pot fi solubilizate direct în apa de diluție.

**▼B**

Substanțele se testează în mod normal numai până la limita solubilității. Pentru unele substanțe (de exemplu: substanțele puțin solubile în apă sau cele cu  $P_{ow}$  ridicat sau care formează dispersii stabile în loc de soluții apoase propriu-zise), se acceptă folosirea unei concentrații deasupra limitei de solubilitate a substanței, pentru a garanta concentrația maximă solubilă/stabilă. Cu toate acestea, este important ca această concentrație să nu perturbe sistemul de testare (de exemplu, o peliculă de substanță pe suprafața apei care să împiedice oxigenarea apei etc.).

Pentru a prepara soluțiile mamă ale substanțelor cu solubilitate scăzută în apă sau pentru a facilita dispersia acestor substanțe în mediul de testare se pot folosi dispersia cu ultrasunete, solvenți organici, agenți de emulsionare sau agenți de dispersie. În cazul în care se folosesc astfel de substanțe auxiliare, toate concentrațiile trebuie să conțină aceeași cantitate de substanță auxiliară, iar peștii martor sunt tratați cu aceeași concentrație a substanței auxiliare ca și cea folosită în loturile tratate. Concentrația unor astfel de substanțe auxiliare trebuie redusă la minimum și în niciun caz nu trebuie să depășească 100 mg/l.

Testul se efectuează fără reglarea pH-ului. Dacă există dovada unei schimbări pronunțate a pH-ului, se recomandă ca testul să se repete după reglarea pH-ului, iar rezultatele să se consemneze. În acest caz, valoarea pH-ului soluției mamă se reglează la valoarea pH-ului apei de diluție, dacă nu există contraargumente specifice. Pentru reglarea pH-ului sunt preferate HCl și NaOH. Această reglare a pH-ului se face astfel încât concentrația substanței de testat din soluția mamă să nu se modifice în mod semnificativ. Dacă în urma acestei corecții de pH are loc o reacție chimică sau precipitarea fizică a substanței de testat, acest lucru trebuie consemnat.

#### 1.6.1.2. *Apa de întreținere și de diluție*

Se poate folosi apa potabilă (necontaminată de concentrații potențial dăunătoare de clor, metale grele sau alte substanțe), apa naturală de calitate bună sau apa reconstituită (a se vedea apendicele 1). Se preferă apa cu o duritate totală între 10 și 250 mg/l ( $\text{CaCO}_3$ ) și cu un pH cuprins în intervalul 6,0-8,5.

#### 1.6.2. **Aparatură**

Toată aparatura este confecționată din material inert din punct de vedere chimic.

— sistem automat de diluare (pentru testare în condiții dinamice);

— oxigenometru;

— echipament pentru determinarea durității apei;

— aparatură adecvată pentru controlul temperaturii;

— pH-metru.

#### 1.6.3. **Pești de experiență**

Peștii trebuie să fie sănătoși și fără malformații vizibile.

**▼B**

Speciile folosite sunt selectate pe baza unor criterii practice cum sunt: disponibilitatea lor tot timpul anului, întreținere ușoară, testare convenabilă, sensibilitatea relativă la substanțe chimice și orice factor economic și biologic sau ecologic important. La selectarea speciilor de pești se va ține seama de necesitatea comparabilității datelor obținute și de armonizarea internațională existentă (referința bibliografică 1).

Lista speciilor de pești recomandate pentru efectuarea acestui test este prezentată în apendicele 2; peștele zebură și păstrăvul curcubeu sunt speciile preferate.

#### 1.6.3.1. *Întreținere*

Peștii supuși testului trebuie, de preferință, să provină dintr-un singur lot ai cărui indivizi au lungimea și vârsta asemănătoare. Sunt ținuți timp de cel puțin 12 zile în condițiile următoare:

*încărcătură:*

adecvată sistemului folosit (recirculare sau în regim dinamic) și de specia de pești;

*apă:*

a se vedea punctul 1.6.1.2;

*lumină:*

iluminare 12-16 ore pe zi;

*concentrația de oxigen dizolvat:*

cel puțin 80 % din valoarea de saturație în aer;

*alimentație:*

zilnic sau de 3 ori pe săptămână, cu o pauză de 24 de ore înaintea începerii testului.

#### 1.6.3.2. *Mortalitate*

După o perioadă de 48 de ore de adaptare, se înregistrează mortalitatea și se aplică următoarele criterii:

— mai mare de 10 % din populație în 7 zile:

respingerea întregului lot;

— între 5 și 10 % din populație:

perioada de întreținere continuă încă 7 zile.

Dacă nu mai apare mortalitate, lotul este acceptat, în caz contrar este respins;

— sub 5 % din populație:

acceptarea lotului.

#### 1.6.4. *Adaptare*

Toți peștii trebuie să fie ținuti în apă de calitate și temperatura care urmează să fie folosite la test, timp de cel puțin 7 zile înainte de a fi folosiți.



#### 1.6.5. Procedura de testare

Testul principal poate fi precedat de un test de stabilire a intervalului, pentru a obține informații legate de intervalul de concentrații ce urmează să fie folosite.

Pe lângă testarea propriu-zisă, se efectuează un test martor fără substanță de testat și, dacă are semnificație, încă un test martor pentru substanța auxiliară.

În funcție de proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat, se alege metoda adecvată statică, semistatică sau dinamică, pentru a îndeplini criteriile de calitate.

Peștii sunt expuși substanței conform celor descrise mai jos:

- durată: 96 ore;
- numărul de organisme testate: cel puțin 7 pe concentrație;
- vase: de capacitate adecvată în funcție de greutatea recomandată a lotului;
- greutatea lotului testat: se recomandă greutatea maximă de 1 g/l pentru testele în regim static și semistatic; pentru testele în regim dinamic se acceptă o greutate mai mare;
- concentrația testată: cel puțin 5 concentrații spațiate printr-un factor constant care nu depășește 2,2 și, dacă este posibil, într-un interval de 0-100 % mortalitate;
- apă: a se vedea punctul 1.6.1.2;
- lumină: 12-16 ore lumină zilnic;
- temperatură: conform speciei (apendicele 2) dar în limita  $\pm 1$  °C în cadrul fiecărei testări;
- concentrația de oxigen dizolvat: nu mai puțin de 60 % din valoarea de saturație în aer la temperatura selectată;
- hrănire: nu se administrează hrană.

Peștii sunt observați după primele 2-4 ore și la intervale de cel puțin 24 de ore. Peștii se consideră morți dacă atingerea pedunculului caudal nu produce nicio reacție și nu sunt vizibile mișcări de respirație. Peștii morți se îndepărtează în momentul în care sunt observați și se înregistrează mortalitatea. Se ține evidența comportamentului anormal vizibil (de exemplu, pierderea echilibrului, perturbări de înot, funcția respiratorie, pigmentare etc.).

Trebuie să se efectueze zilnic măsurători ale pH-ului, oxigenului dizolvat și temperaturii.

#### *Test-limită*

Folosind modul de operare descris în prezenta metodă de testare, se poate efectua un test-limită la 100 mg/l pentru a demonstra că CL<sub>50</sub> este mai mare decât această concentrație.

Dacă natura substanței nu permite atingerea concentrației de 100 mg/l în soluția de testare, testul-limită se efectuează la o concentrație egală cu solubilitatea substanței (sau concentrația maximă pentru formarea unei dispersii stabile) în mediul folosit (a se vedea și punctul 1.6.1.1).



**▼B**

Testul-limită se efectuează folosind între 7 și 10 pești, cu același număr de teste martor. (Conform teoriei binomului, dacă se folosesc 10 pești și mortalitatea este 0, există 99,99 % încredere că  $CL_{50}$  este mai mare decât concentrația folosită în testul-limită. Cu 7, 8 sau 9 pești, absența mortalității asigură cel puțin 99 % încredere că  $CL_{50}$  este mai mare decât concentrația folosită).

Dacă apare mortalitate, trebuie să se efectueze un studiu complet. Dacă se observă efecte subletale, acestea se înregistrează.

## 2. **DATE ȘI EVALUARE**

Pentru fiecare perioadă în care s-au înregistrat observații (24, 48, 72 și 96 de ore) se reprezintă grafic mortalitatea exprimată în procente, în funcție de concentrație, pe o hârtie probit logaritmică.

Dacă este posibil, pentru fiecare perioadă de observare se estimează  $CL_{50}$  și limitele de încredere ( $p = 0,05$ ) prin metode standard; aceste valori se rotunjesc la una sau cel mult două cifre semnificative (exemple de rotunjire la două cifre: 170 pentru 173,5; 0,13 pentru 0,127; 1,2 pentru 1,21).

În cazul în care panta curbei de răspuns concentrație/procentaj este prea abruptă pentru a permite calcularea valorii  $CL_{50}$ , este suficientă estimarea grafică a acestei valori.

În cazul în care două concentrații consecutive aflate în raport de 2,2 dau numai 0 și 100 % mortalitate, aceste două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se situează  $CL_{50}$ .

Dacă se observă că stabilitatea sau omogenitatea substanței de testat nu poate fi menținută, acest lucru se consemnează, iar rezultatele trebuie interpretate cu atenție.

## 3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

- informații despre peștii de experiență (denumirea științifică, linia, furnizorul, orice tratament preliminar, dimensiunea și numărul folosit pentru fiecare concentrație testată);
- sursa apei de diluție și caracteristicile chimice principale (pH, duritate, temperatură);
- în cazul unei substanțe puțin solubile în apă, metoda de preparare a soluției mamă și a soluțiilor de testare;
- concentrația eventualelor substanțe auxiliare;
- lista concentrațiilor folosite și orice informații disponibile legate de stabilitatea substanțelor chimice la concentrațiile din soluția de testare;
- dacă se efectuează analize chimice, metodele folosite și rezultatele obținute;
- rezultatele testului-limită, după caz;
- motivele alegerii metodei de testare folosite și detalii cu privire la aceasta (de exemplu: statică, semistatică, raportul dozelor, viteza curgerii, condițiile de aerare, greutatea lotului de pești testat etc.);

**▼B**

- descrierea echipamentului de testare;
- regimul de iluminare;
- concentrațiile de oxigen dizolvat, valorile pH-ului și temperaturile soluțiilor testate la fiecare 24 de ore;
- dovada îndeplinirii criteriilor de calitate;
- tabelul care prezintă mortalitatea cumulată pentru fiecare concentrație testată și înregistrările aferente controlului (inclusiv pentru testul maror cu substanță auxiliară, după caz) la fiecare perioadă de observație recomandată;
- graficul curbei de răspuns concentrație/procentaj la sfârșitul testării;
- dacă e posibil, valorile CL<sub>50</sub> la fiecare perioadă de observație recomandată (cu limite de încredere de 95 %);
- metodele statistice folosite pentru determinarea valorilor CL<sub>50</sub>;
- dacă s-a folosit o substanță de referință, rezultatele obținute;
- concentrația testată maximă care nu provoacă mortalitate pe durata testării;
- concentrația testată minimă care provoacă mortalitate 100 % pe durata testării.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.
3. AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.
4. ISO 7346/1,2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
5. Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).
7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
8. NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

**▼B**

11. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
12. Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
15. Litchfield, J. T and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, p. 99.
16. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
17. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, p. 793-821.
18. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, p. 3-32.
19. Stephan, C.E. Methods for calculating an  $LC_{50}$ . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, p. 65-84.
20. Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an  $LC_{50}$ . US EPA.



### *Apendicele 1*

#### **Apă reconstituită**

##### *Exemplu de apă de diluție adecvată*

Toate substanțele chimice sunt de puritate analitică.

Apa este apă distilată și de calitate bună sau apă deionizată cu o conductibilitate mai mică de  $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

Aparatura pentru distilarea apei trebuie să nu conțină nicio piesă din cupru.

##### *Soluțiile mamă*

|   |         |
|---|---------|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (clorură de calciu dihidrat):     | 11,76 g |
| Dizolvată și completată până la 1 litru cu apă.                         |         |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (sulfat de magneziu heptahidrat): | 4,93 g  |
| Dizolvat și completat până la 1 litru cu apă.                           |         |
| NaHCO <sub>3</sub> (carbonat acid de sodiu):                            | 2,59 g  |
| Dizolvat și completat până la 1 litru cu apă.                           |         |
| KCl (clorură de potasiu):   | 0,23 g  |
| Dizolvată și completată până la 1 litru cu apă.                         |         |

##### *Apă de diluție reconstituită*

Se adaugă câte 25 ml din cele patru soluții mamă și se completează până la 1 litru cu apă.

Se aerează până când concentrația oxigenului dizolvat este egală cu valoarea de saturație în aer.

PH-ul este  $7,8 \pm 0,2$ .

Dacă este necesar, pH-ul se reglează cu NaOH (hidroxid de sodiu) sau HCl (acid clorhidric).

Apa de diluție astfel preparată este lăsată în repaos aproximativ 12 ore și nu mai este aerată.

Suma ionilor de Ca și Mg în această soluție este 2,5 mmol/l. Raportul ionilor Ca:Mg este 4:1, iar cel al ionilor Na:K este 10:1. Alcalinitatea totală a acestei soluții este 0,8 mmol/l.

Orice abatere în prepararea apei de diluție nu trebuie să schimbe compoziția sau proprietățile apei.



## Appendicele 2

### Speciile de pești recomandate pentru testare

| Speciile recomandate  | Intervalul de temperatură recomandat pentru testare ( °C) | Lungimea totală recomandată a animalului de experiență (cm) |
|---|---|---|
| <i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae)<br>(Hamilton-Buchanan) Peștele zebră       | 20-24   | 3,0 ± 0,5   |
| <i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae)<br>(Rafinesque) Boiștean                 | 20-24   | 5,0 ± 2,5   |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae)<br>(Linnaeus 1758) Căpă comun                | 20-24   | 6,0 ± 2,0   |
| <i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) | 20-24   | 3,0 ± 1,0   |
| <i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae)<br>(Peters 1859) Guppy                  | 20-24   | 3,0 ± 1,0   |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758)            | 20-24   | 5,0 ± 2,0   |
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Păstrăv curcubeu         | 12-17   | 6,0 ± 2,0   |
| <i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae)<br>(Linnaeus 1758) Văduviță                   | 20-24   | 6,0 ± 2,0   |

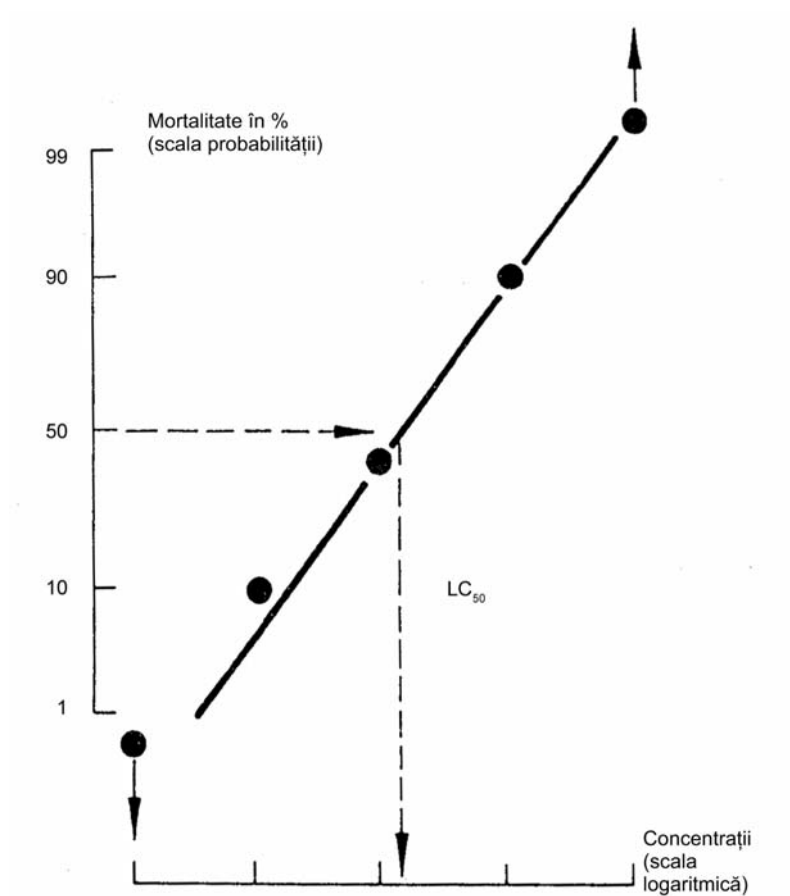
### Aprovizionare

Peștii din lista de mai sus sunt ușor de crescut și/sau se găsesc din abundență în tot timpul anului. Pot fi crescuți și înmulți în crescătoriile de pești sau în laborator, în condiții controlate de boală și paraziți astfel încât animalele testate să fie sănătoase și cu ascendență cunoscută. Acești pești sunt disponibili în multe locuri ale lumii.

▼ B

## Apendicele 3

## Exemplu de înregistrare grafică: concentrație/procentul de mortalitate

Exemplu de determinare a  $CL_{50}$  cu hârtie probit logaritmică

**▼B****C.2. DAPHNIA SP. TESTUL IMOBILIZĂRII ACUTE****1. METODĂ**

Această metodă de testare a imobilizării acute este echivalentă cu Orientarea 202 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Această metodă descrie un test de toxicitate acută care are rolul de a evalua efectele substanțelor chimice asupra dafniilor. Utilizarea măsurilor de testare existente s-a făcut în limita posibilului (1) (2) (3).

**1.2. DEFINIȚII**

În contextul utilizării acestei metode s-au folosit următoarele definiții:

**CE<sub>50</sub>**: concentrația estimată capabilă să imobilizeze 50 % din dafnii în cadrul unei perioade de expunere determinate. În cazul în care se utilizează o altă definiție, aceasta trebuie raportată împreună cu referința.

**Imobilizare**: animalele incapabile să înoate în intervalul de 15 secunde după agitarea ușoară a recipientului de testare sunt considerate ca fiind imobilizate (chiar dacă își pot mișca încă antenele).

**1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Dafniile tinere, cu vârsta mai mică de 24 ore în momentul începerii testului, sunt expuse timp de 48 de ore la diferite concentrații ale substanței de testare. Imobilizarea este înregistrată la 24 și la 48 de ore și comparată cu valorile de control. Se analizează rezultatele în scopul calculării CE<sub>50</sub> la 48 de ore (a se vedea punctul 1.2 pentru definiții). Determinarea CE<sub>50</sub> la 24 de ore este opțională.

**1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE**

Se recomandă cunoașterea solubilității în apă și a presiunii vaporilor substanței de testare și existența unei metode analitice fiabile pentru dozarea substanței în soluțiile de testare, ale cărei eficiență de recuperare și limită de determinare sunt cunoscute. Informațiile utile includ formula structurală, gradul de puritate al substanței, stabilitatea în apă sau la lumină, coeficientul de partiție octanol/apă – log P<sub>ow</sub> și rezultatele unui test privind biodegradabilitatea imediată (a se vedea metoda C.4).

Notă: Referința 4 furnizează recomandări în ceea ce privește substanțele de testare cu proprietățile fizice și chimice care fac dificilă testarea acestora.

**1.5. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

O substanță de referință poate fi testată pentru determinarea CE<sub>50</sub> ca o metodă de siguranță în sensul fiabilității condițiilor de testare. Se recomandă în acest scop substanțe toxice utilizate în testele circulare internaționale (1) (5) <sup>(1)</sup>. Se recomandă ca testele cu o substanță de referință să se realizeze de preferință în fiecare lună și cel puțin de două ori pe an.

<sup>(1)</sup> Rezultatele acestor teste între laboratoare, precum și un corringedum tehnic la ISO 6341 oferă un CE<sub>50</sub> la 24 h al dicromatului de potasiu (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) cuprins în intervalul 0,6-1,7 mg/l.

**▼B****1.6. CRITERII DE CALITATE**

Pentru ca testul să fie valid, se aplică următoarele criterii de performanță:

- în cadrul grupurilor de control, inclusiv grupul de control care conține agent de solubilizare, se recomandă a fi imobilizate cel mult 10 % dintre dafnii;
- concentrația de oxigen dizolvată la sfârșitul testului ar trebui să fie  $\geq 3$  mg/l în recipientele de control și testare.

Notă: Pentru primul criteriu, cel mult 10 % dintre dafniile din grupul de control trebuie să fie imobilizate sau să prezinte alte semne de boală sau de stres, precum decolorare sau comportament neobișnuit (de exemplu, rămân prinse la suprafața apei).

**1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.7.1. Aparatură**

Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu soluțiile de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic. În mod normal recipientele de testare sunt eprubete sau pahare de laborator. Se recomandă curățarea acestora înainte de fiecare utilizare prin metodele standard de laborator. Se recomandă ca recipientele de testare să fie acoperite pentru a reduce pierderea de apă prin evaporare, precum și pentru a se evita pătrunderea de praf în soluții. Se recomandă ca substanțele volatile să fie testate în recipiente umplute complet și închise, suficient de mari astfel încât concentrația de oxigen să nu fie prea slabă sau limitată (a se vedea punctul 1.6 și primul alineat al punctului 1.8.3).

În plus, se vor folosi unul sau toate echipamentele următoare: un aparat pentru măsurarea concentrației de oxigen (cu microelectrod sau un alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în mostre de volum mic); un aparat pentru măsurarea pH-ului; aparatură adecvată pentru controlul temperaturii; echipament pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT); echipament pentru determinarea necesarului de oxigen chimic (NOC); echipament pentru determinarea durității etc.

**1.7.2. Organism de testare**

Specia preferată pentru testare este *Daphnia magna* Straus, deși se pot folosi pentru acest test și alte specii de *Daphnia* adecvate (de exemplu, *Daphnia pulex*). La începutul testului, animalele trebuie să aibă vârsta mai mică de 24 de ore, iar pentru reducerea variabilității, se recomandă ca acestea să nu provină din prima generație de descendenți. Se recomandă să provină dintr-un lot sănătos (să nu prezinte semne de stres cum ar fi mortalitatea ridicată, prezența masculilor și ehippia, întârzieri în producerea primei progenituri, animale decolorate etc.). Se recomandă ca toate organismele utilizate pentru un anumit test să provină din culturi înființate din același lot de dafnii. Lotul respectiv trebuie să fie menținut în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu) similare cu cele utilizate în timpul testului. Dacă mediul de cultură al dafniilor care vor fi utilizate în timpul testului diferă de cel utilizat în mod normal pentru o cultură de dafnii, este bine să se includă o perioadă de acclimatizare înainte de test. De aceea, se recomandă ca dafniile provenite din aceeași cultură să fie menținute în apă de diluare la temperatura de testare timp de aproximativ 48 ore înainte de începerea testului.



## ▼B

1.7.3. **Apa de păstrare și diluare**

Sunt acceptate ca lichid de păstrare și de diluare apele naturale (de suprafață și subterane), lichid reconstituit sau apă de la robinet decolorată dacă dafniile vor supraviețui în acesta pe durata culturii, aclimatizării și testării fără a prezenta semne de stres. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil așa cum este prezentat în apendicele 1 este potrivit ca apă pentru testare. Este bine ca aceasta să aibă o calitate constantă de-a lungul perioadei de testare. Apa reconstituită poate fi obținută prin adăugarea, la apa deionizată sau distilată, a unei cantități specifice de reactivi având o gradare analitică recunoscută. Referințele 1, 6 și apendicele 2 oferă exemple de apă reconstituită. A se observa că mediile care conțin agenți de chelare cunoscuți, cum ar fi mediile M4 și M7 din apendicele 2, trebuie evitate la testarea substanțelor care conțin metale. Se recomandă un pH într-o gamă de la 6 la 9. Pentru *Daphnia Magna* se recomandă o duritate cuprinsă între 140 și 250 mg/l (cum ar fi  $\text{CaCO}_3$ ), în timp ce un grad mai scăzut de duritate poate fi adecvat pentru alte specii de *Daphnia*. Apa pentru diluare poate fi aerată înainte de a fi utilizată pentru test astfel încât concentrația de oxigen dizolvat să fi atins gradul de saturație.

Dacă se utilizează apă naturală, se recomandă ca parametrii de calitate să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că aceste caracteristici este posibil să se fi schimbat semnificativ (a se vedea alineatul anterior și apendicele 1). De asemenea, se recomandă realizarea măsurătorilor concentrației de metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Dacă se utilizează apă de robinet decolorată, este de dorit să se realizeze o analiză zilnică a conținutului de cloruri. Dacă apa de diluare provine de la o apă de suprafață sau subterană, se recomandă măsurarea necesarului de conductivitate și carbon organic total (COT) sau de oxigen chimic.

1.7.4. **Soluții de testare**

Soluțiile de testare cu concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții din stoc. Este preferabil ca soluțiile din stoc să se prepare prin dizolvarea substanței de testare în apa de diluare. Pe cât posibil, se recomandă evitarea solvenților, a emulsifiantilor sau a dispersanților. Totuși, astfel de componente pot fi necesare în anumite situații pentru a se produce o soluție de stoc cu o concentrație corespunzătoare. Recomandări privind solvenții, emulsifiantii și dispersanții adecvați se regăsesc la referința 4. În orice caz, se recomandă ca substanțele de testare din soluțiile de testare să nu depășească limita solubilității în apa de diluare.

Se recomandă ca testul să se desfășoare fără a se regla pH-ul. Dacă pH-ul nu rămâne în interiorul gamei 6-9, atunci se poate realiza un al doilea test, reglând pH-ul soluției de stoc la acela al apei de diluare înainte de adăugarea substanței de testare. Se recomandă ca reglarea pH-ului să se facă astfel încât concentrația soluției de stoc să nu fie schimbată semnificativ și astfel încât să nu se producă nicio reacție chimică sau precipitare a substanței de testare. Se preferă HCl și NaOH.

**▼B****1.8. PROCEDURĂ****1.8.1. Condiții de expunere****1.8.1.1. Grupuri de testare și control**

Vasele pentru testare se umplu cu volume corespunzătoare de apă diluată și soluții de substanțe de testare. Se recomandă ca proporția aer/volum de apă din vas să fie identică pentru grupurile de testare și control. Se plasează apoi dafniile în vasele de testare. Se recomandă a se utiliza cel puțin 20 de animale, împărțite în patru grupuri de câte cinci animale fiecare, la fiecare concentrație a testului și pentru controale. Se vor furniza cel puțin 20 ml de soluție pentru fiecare animal (respectiv o cantitate de 10 ml pentru cinci dafnii pe fiecare vas de testare). Atunci când concentrația substanței de testare nu este stabilă, testul se poate desfășura utilizând un sistem de reînnoire semi-statică sau continuă.

În plus față de seria pentru tratament, trebuie desfășurate o serie de control a apei de diluare și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de control conținând agent de solubilizare.

**1.8.1.2. Concentrațiile pentru testare**

Se poate desfășura un test pentru definirea gamei de concentrații de utilizat la testarea definitivă cu condiția să existe informații privind toxicitatea substanței de test. În acest scop, dafniile sunt expuse unei serii de concentrații a substanței de testare întinsă pe un interval larg. Se vor expune un număr de cinci dafnii la fiecare concentrație de testare timp de 48 ore sau mai puțin, și nu este necesară repetarea. Perioada de expunere poate fi scurtată (de exemplu, 24 ore sau mai puțin) dacă datele necesare desfășurării testului de definire a gamei pot fi obținute în mai puțin timp.

Se recomandă a se utiliza cel puțin cinci concentrații de testare. Se recomandă aranjarea acestora într-o serie geometrică având un factor de separare care este preferabil să nu depășească 2.2. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se vor aduce argumente pentru aceasta. Este de preferat ca cea mai înaltă concentrație testată să conducă la o imobilizare de 100 %, iar cea mai joasă concentrație testată este preferabil să nu producă efecte observabile.

**1.8.1.3. Condiții de incubare**

Este recomandat ca temperatura să se situeze în intervalul 18-22 °C, iar în cazul unei singure testări, este bine ca aceasta să rămână constantă în limita  $\pm 1$  °C. Se recomandă un ciclu de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric. Se acceptă și întuneric deplin, în special pentru substanțele de testare care prezintă instabilitate la lumină.

Este interzis ca vasele să fie aerate pe perioada testării. Testul se desfășoară fără reglarea pH-ului. Se recomandă ca dafniile să nu fie hrănite pe perioada testului.

**1.8.1.4. Durată**

Durata testului este de 48 ore.

**1.8.2. Observații**

La fiecare 24 ore și 48 ore după începerea testării, fiecare vas de testare va fi verificat pentru depistarea dafniilor imobilizate (a se vedea punctul 1.2 pentru definiții). În plus față de imobilitate, se va raporta orice reacție sau imagine anormală.

**▼B****1.8.3. Măsurători analitice**

Se măsoară oxigenul dizolvat și pH-ul la începutul și la sfârșitul testării și concentrația cea mai înaltă a substanței de testare și de control. Se recomandă o concentrație a oxigenului dizolvat care să fie în concordanță cu criteriile de validitate (a se vedea punctul 1.6). În mod normal concentrația pH-ului nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în cadrul oricărui test. De obicei se măsoară temperatura în vasele de control sau în aerul ambiental și se recomandă ca aceasta să fie înregistrată, de preferință, în mod continuu pe perioada testului sau, ca cerință minimă, la începutul și la sfârșitul testării.

Se recomandă măsurarea concentrației substanței de testare cel puțin la valoarea maximă și la valoarea minimă, la începutul și la sfârșitul testării (4). Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Totuși, dacă există probe care să demonstreze că s-a menținut concentrația substanței de testare în mod corespunzător în intervalul  $\pm 20\%$  față de concentrația nominală sau măsurată inițial, pe tot parcursul perioadei de testare, atunci rezultatele pot fi calculate pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial.

**1.9. TEST-LIMITĂ**

Utilizând procedurile descrise în prezenta metodă, se poate efectua un test-limită la 100 mg/l de substanță de testare sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare (oricare dintre acestea este mai scăzută) pentru a demonstra că  $CE_{50}$  este mai mare decât această concentrație. Se recomandă efectuarea testului-limită prin utilizarea a 20 de dafnii (împărțite preferabil în patru grupuri de câte cinci), cu același număr de animale grupurile de control. Dacă imobilizarea se manifestă, se va realiza un studiu complet. Se va înregistra orice reacție anormală detectată.

**2. DATE**

Datele sunt sintetizate sub formă de tabel, indicând, pentru fiecare grup de tratament și control, numărul de dafnii utilizat, imobilizarea la fiecare observare. Procentele imobilizate la 24 și 48 de ore se vor pondera față de concentrațiile de testare. Datele se analizează cu mijloace statistice adecvate (de exemplu analiză de probitate etc.) pentru a se calcula pantele curbelor și  $CE_{50}$  în limite de fiabilitate de 95 % ( $p = 0,05$ ) (7) (8).

În situațiile în care metodele standard de calculare a  $CE_{50}$  nu sunt aplicabile pentru datele obținute, se recomandă utilizarea celei mai mari concentrații care nu produce imobilitate și a celei mai scăzute concentrații care produce imobilitate 100 % ca metodă de aproximare a  $CE_{50}$  (aceasta devenind media geometrică a acestor două concentrații).

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare va include următoarele:

Substanța de testare:

— stare fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

**▼B**

- date de identificare de natură chimică, inclusiv puritatea.

Specia folosită pentru testare:

- sursa și speciile de *Daphnia*, originea sursei (dacă este cunoscută) și condițiile de cultură utilizate (inclusiv origine, tip și cantitate de hrană, frecvența hrănirii).

Condiții de testare:

- descrierea vaselor de testare: tipul de vase, volumul soluției, numărul de dafnii pe vas de testare, numărul de vase de testare (replicate) pe concentrație;
- metode de preparare a stocului și a soluțiilor de testare, inclusiv utilizarea oricărui solvent sau dispersant, concentrațiile utilizate;
- detalii privind apa utilizată pentru diluare: caracteristicile sursei și calității apei (pH, duritate; proporția Ca/Mg; proporția Na/K; alcalinitate, conductivitate etc.); compoziția apei reconstituite dacă aceasta a fost utilizată;
- condiții de incubare: temperatură, intensitatea și frecvența luminii; cantitatea de oxigen dizolvat, pH etc.

Rezultate:

- numărul și procentajul de dafnii care au fost imobilizate sau care au prezentat efecte negative (inclusiv reacții anormale) în grupurile de control și în fiecare grup de tratare, la fiecare interval de observare și o descriere a naturii efectelor observate;
- rezultatele și datele testului efectuat cu substanțe de referință, dacă sunt disponibile;
- valorile nominale ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru a determina concentrația substanței de testare în vasele de testare; de asemenea, se vor raporta eficiența de recuperare a metodei și limita de determinare;
- toate măsurătorile fizico-chimice ale temperaturii, pH-ului și oxigenului dizolvat de-a lungul perioadei de testare;
- CE<sub>50</sub> la 48 de ore referitor la imobilizare cu limite de fiabilitate și grafice ale modelului adecvat utilizat pentru calcul, pantele curbilor de răspuns la dozaj și eroarea standard; procedurile statistice utilizate pentru determinarea CE<sub>50</sub>; (aceste informații referitoare la imobilizare la 24 de ore se vor raporta la momentul la care au fost măsurate);
- explicații privind orice abatere de la metoda de testare și dacă abaterea a afectat rezultatele testului.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.
2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

**▼B**

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* sp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC<sub>50</sub>. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials, p. 65-84.
8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3<sup>rd</sup> ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

**▼B***APENDICELE 1***ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUARE  
DE NIVEL ACCEPTABIL**

| Substanță   | Concentrație |
|---|--------------|
| Particule   | < 20 mg/l    |
| Carbon organic total  | < 2 mg/l     |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l     |
| Clorură reziduală   | < 10 µg/l    |
| Cantitate totală de pesticide organofosforoase                            | < 50 ng/l    |
| Cantitate totală de pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l    |
| Cantitate totală de clorură organică                                      | < 25 ng/l    |



## APENDICELE 2

### EXEMPLE DE APĂ DE TESTARE RECONSTITUITĂ ACCEPTABILĂ

#### ISO Apă de testare (I)

| Soluție de stoc (o singură substanță)                      |                                      | Pentru prepararea apei reconstituite, se adaugă următoarele volume de soluții din stoc la 1 l de apă (*) |
|--|--------------------------------------|--|
| Substanță  | Cantitate adăugată la 1 l de apă (*) |  |
| Clorură de calciu<br>$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  | 11,76 g                              | 25 ml  |
| Sulfat de magneziu<br>$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 4,93 g                               | 25 ml  |
| Bicarbonat de sodiu<br>$\text{NaHCO}_3$                    | 2,59 g                               | 25 ml  |
| Clorură de potasiu<br>$\text{KCl}$                         | 0,23 g                               | 25 ml  |

(\*) Apă cu un grad de puritate adecvat, de exemplu deionizată, distilată sau obținută prin osmoză inversă, cu o conductivitate de preferință inferioară valorii de  $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### Medii Elendt M4 și M7

##### Aclimatizare la mediile Elendt M4 și M7

Anumite laboratoare au întâmpinat dificultăți în a transfera direct *Daphnia* în mediile M4 și M7. Totuși, au fost obținute anumite succese printr-o aclimatizare graduală, respectiv prin mutarea din propriul mediu la 30 % Elendt, apoi la 60 % Elendt și apoi la 100 % Elendt. Este posibil ca perioada de aclimatizare să ajungă până la o lună.

##### Pregătire

##### Element de urmărire

Soluțiile de stoc separate (I), conținând elemente individuale de urmărire se prepară mai întâi în apă cu o puritate adecvată, de exemplu, deionizată, distilată sau obținută prin osmoză inversă. Din aceste soluții de stoc diferite (I) se prepară o singură soluție de stoc (II), care conține toate elementele de urmărire (soluție combinată), de exemplu:

| Soluție (soluții) de stoc I (o singură substanță) | Cantitate adăugată la apă (mg/l) | Concentrație (în raport cu mediul M4) | Pentru prepararea soluției combinate de stoc II, se adaugă următoarele volume de soluții de stoc I la cantitatea de apă (ml/l) |      |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|--|------|
|   |                                  |                                       | M4   | M7   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                           | 57 190                           | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$          | 7 210                            | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| $\text{LiCl}$                                     | 6 120                            | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |

**▼B**

| Soluție (soluții) de stoc I (o singură substanță)   | Cantitate adăugată la apă (mg/l) | Concentrație (în raport cu mediul M4) | Pentru prepararea soluției combinate de stoc II, se adaugă următoarele volume de soluții de stoc I la cantitatea de apă (ml/l) |      |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|--|------|
|   |                                  |                                       | M4   | M7   |
| RbCl  | 1 420                            | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 3 040                            | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| NaBr  | 320                              | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 1 230                            | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 335                              | 20 000 de ori                         | 1,0  | 0,25 |
| ZnCl <sub>2</sub>                                   | 260                              | 20 000 de ori                         | 1,0  | 1,0  |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 200                              | 20 000 de ori                         | 1,0  | 1,0  |
| KI  | 65                               | 20 000 de ori                         | 1,0  | 1,0  |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                    | 43,8                             | 20 000 de ori                         | 1,0  | 1,0  |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>                     | 11,5                             | 20 000 de ori                         | 1,0  | 1,0  |
| Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O              | 5 000                            | 2 000 de ori                          | —  | —    |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 1 991                            | 2 000 de ori                          | —  | —    |

Ambele soluții, Na<sub>2</sub> EDTA și FeSO<sub>4</sub>, se prepară independent, se toarnă împreună și se autoclavează imediat.

Aceasta conduce la:

|                     |  |              |      |     |
|---------------------|--|--------------|------|-----|
| Soluție 2 l Fe-EDTA |  | 1 000 de ori | 20,0 | 5,0 |
|---------------------|--|--------------|------|-----|

*Mediile M4 și M7*

Mediile M4 și M7 se prepară utilizând soluția de stoc II, macro-nutrienți și vitamine după cum urmează:

|   | Cantitate adăugată la apă (mg/l) | Concentrație (în raport cu mediul M4) | Cantitate de soluție de stoc II adăugată pentru a prepara mediul (ml/l) |     |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|-----|
|   |                                  |                                       | M4  | M7  |
| Soluție de stoc II (elemente de urmărire combinate)               |                                  | 20 de ori                             | 50  | 50  |
| Soluții complexe pe bază de macro nutrienți (substanță singulară) |                                  |                                       |   |     |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                             | 293 800                          | 1 000 de ori                          | 1,0   | 1,0 |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                             | 246 600                          | 2 000 de ori                          | 0,5   | 0,5 |
| KCl   | 58 000                           | 10 000 de ori                         | 0,1   | 0,1 |
| NaHCO <sub>3</sub>  | 64 800                           | 1 000 de ori                          | 1,0   | 1,0 |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O              | 50 000                           | 5 000 de ori                          | 0,2   | 0,2 |
| NaNO <sub>3</sub>   | 2 740                            | 10 000 de ori                         | 0,1   | 0,1 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                   | 1 430                            | 10 000 de ori                         | 0,1   | 0,1 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                   | 1 840                            | 10 000 de ori                         | 0,1   | 0,1 |



**▼B**

|   | Cantitate adăugată la apă (mg/l) | Concentrație (în raport cu mediul M4) | Cantitate de soluție de stoc II adăugată pentru a prepara mediul (ml/l) |     |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|-----|
|   |                                  |                                       | M4  | M7  |
| Soluție de stoc de vitamine combinate   | —                                | 10 000 de ori                         | 0,1   | 0,1 |
| Soluția de stoc pe bază de vitamine combinate se prepară prin adăugarea a 3 vitamine la 1 l de apă, după cum se indică mai jos: |                                  |                                       |   |     |
| Clorhidrat de tiamină   | 750                              | 10 000 de ori                         |   |     |
| Cianocobalamin (B <sub>12</sub> )   | 10                               | 10 000 de ori                         |   |     |
| Biotină   | 7,5                              | 10 000 de ori                         |   |     |

Soluția pe bază de vitamine combinate se păstrează congelată în alicoturi. Vitaminele se adaugă în medii imediat înainte de utilizare.

NB: Pentru a evita precipitarea sărurilor atunci când se pregătesc mediile finale, se adaugă conținutul din alicoturi de substanță de stoc la o cantitate de aproximativ 500-800 ml de apă deionizată și apoi se umple până la 1 l.

NB: Prima publicație referitoare la mediul M4 se găsește în Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, p. 25-33.

## ▼ M6

**C.3. ALGE DE APĂ DULCE ȘI CIANOBACTERII, TEST DE INHIBARE A CREȘTERII****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 201 (2006, anexă corectată în 2011). A fost identificată nevoia extinderii metodei de testare pentru a include specii suplimentare și a actualizării acesteia pentru a îndeplini cerințele privind evaluarea pericolelor și clasificarea substanțelor chimice. Această revizuire a fost efectuată pe baza unei experiențe practice vaste, a progresului științific în domeniul studierii toxicității algelor și a utilizării largi în domeniul reglementării care s-au înregistrat după adoptarea inițială.
2. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

3. Scopul acestui test constă în determinarea efectelor unei substanțe chimice asupra creșterii microalgelor de apă dulce și/sau a cianobacteriilor. Organismele de testare cu o creștere exponențială se expun substanței chimice de testare sub formă de loturi de cultură în general pentru o perioadă de 72 de ore. În pofida duratei relativ scurte a testului, se pot evalua efectele asupra câtorva generații.
4. Sistemul răspunde prin reducerea creșterii la o serie de culturi de alge (unități de testare) expuse la diferite concentrații ale unei substanțe chimice de testare. Răspunsul se evaluează ca funcție a concentrației de expunere în comparație cu creșterea medie a culturilor de control duplicate și neexpuse. Pentru exprimarea completă a răspunsului sistemului la efecte toxice (sensibilitate optimă), culturilor le este permisă o creștere exponențială nerestricționată în condiții de hrănire suficientă și lumină continuă, pentru o perioadă de timp suficientă pentru măsurarea reducerii vitezei specifice de creștere.
5. Creșterea și inhibarea creșterii sunt cuantificate prin măsurări ale biomasei de alge în funcție de timp. Biomasa de alge se definește ca greutate uscată per volum, de exemplu mg alge/litru soluție de testare. Totuși, greutatea uscată este dificil de măsurat și, prin urmare, se folosesc parametri înlocuitori. Dintre acești înlocuitori, numărul celulelor este cel mai des folosit. Alți parametri înlocuitori sunt volumul celulelor, fluorescența, densitatea optică etc. Este necesară cunoașterea unui factor de conversie între parametrul înlocuitor măsurat și biomasă.
6. Punctul final de testare este inhibarea creșterii, exprimată ca creștere logaritmică a biomasei (viteza medie specifică de creștere) în timpul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a vitezei de creștere specificată de  $x\%$  (de exemplu  $50\%$ ) se determină din vitezele medii specifice de creștere înregistrate pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca  $E_rC_x$  (de exemplu  $E_rC_{50}$ ).
7. O variabilă de răspuns suplimentară folosită în această metodă de testare este randamentul, care poate fi necesar pentru îndeplinirea unor cerințe de reglementare specifice din unele țări. Acesta se definește ca biomasa de la sfârșitul perioadei de expunere minus biomasa de la începutul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a randamentului specificată de  $x\%$  (de exemplu  $50\%$ ) se calculează din randamentul înregistrat pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca  $E_yC_x$  (de exemplu  $E_yC_{50}$ ).
8. În plus, concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina prin metode statistice.

▼ **M6**

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

9. Informațiile referitoare la substanța chimică de testare, care pot fi utile pentru stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile de testare, proprietățile de absorbție a luminii,  $pK_a$  și rezultatele studiilor de transformare, inclusiv biodegradabilitatea în apă.
10. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă, coeficientul de partiție octanol/apă ( $P_{ow}$ ) și presiunea de vapori a substanței chimice de testare și să fie disponibilă o metodă validată de determinare cantitativă a substanței chimice în soluțiile de testare, cu eficiență a recuperării și limită de detecție cunoscute.

## VALIDITATEA TESTULUI

11. Pentru ca testul să fie valabil, trebuie să se îndeplinească următoarele criterii de performanță:
  - Biomasa din culturile de control trebuie să fi crescut exponențial cu un factor de cel puțin 16 pe durata de 72 ore a perioadei de testare. Acest lucru corespunde unei viteze specifice de creștere de  $0,92 \text{ zi}^{-1}$ . În cazul speciilor utilizate cel mai frecvent, viteza de creștere este de obicei considerabil mai mare (a se vedea apendicele 2). Este posibil ca acest criteriu să nu fie respectat atunci când sunt folosite specii care cresc mai lent decât cele prezentate în apendicele 2. În acest caz, perioada de testare ar trebui extinsă pentru a fi obținută o creștere de cel puțin 16 ori în culturile de control, creșterea trebuind să fie exponențială pe parcursul întregii perioade de testare. Atât timp cât se atinge factorul minim de multiplicare 16, perioada de testare poate fi redusă la cel puțin 48 de ore în scopul menținerii creșterii exponențiale nelimitate în timpul testului.
  - Coeficientul mediu de variație pentru vitezele specifice de creștere pe secțiuni (zilele 0-1, 1-2 și 2-3 pentru testele de 72 ore) în culturile de control (a se vedea apendicele 1 la „coeficient de variație”) nu trebuie să depășească 35 %. Pentru calcularea vitezei specifice de creștere pe secțiuni, a se vedea punctul 49. Acest criteriu se aplică valorii medii a coeficienților de variație calculați pentru culturile de control duplicate.
  - Coeficientul de variație al vitezelor medii specifice de creștere a culturilor de control duplicate nu trebuie să depășească 7 % la testele cu *Pseudokirchneriella subcapitata* și *Desmodesmus subspicatus* pe parcursul întregii perioade de testare. În cazul altor specii mai puțin testate, valoarea nu ar trebui să depășească 10 %.

## SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

12. Substanța (substanțele) chimică (chimice) de referință, cum ar fi 3,5-diclor-fenolul folosit în ring testul internațional (1), poate (pot) fi testată (testate) ca metodă de verificare a procedurii de testare. Dicromatul de potasiu poate fi folosit, de asemenea, ca substanță chimică de referință pentru algele verzi. Este de preferat ca o substanță chimică de referință să fie testată de cel puțin două ori pe an.

## APLICABILITATEA TESTULUI

13. Această metodă de testare se aplică cel mai ușor în cazul substanțelor chimice solubile în apă care, în condițiile testului, sunt susceptibile să rămână în apă. În cazul testării de substanțe chimice volatile, puternic adsorbante, colorate, cu o solubilitate scăzută în apă sau substanțe chimice

**▼ M6**

care pot afecta disponibilitatea nutrienților sau a mineralelor în mediul de testare, pot fi necesare anumite modificări ale procedurii de testare descrise (de exemplu sistem închis, condiționarea vaselor de testare). Orientări privind unele modificări adecvate se găsesc în lucrările (2), (3) și (4).

**DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Aparatură**

14. Vasele de testare și alte echipamente care vor veni în contact cu soluțiile de testare ar trebui să fie în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. Obiectele ar trebui să fie foarte bine spălate pentru prevenirea efectelor contaminanților organici sau anorganici asupra creșterii algelor sau a compoziției soluțiilor de testare.
15. Vasele de testare vor fi în mod normal flacoane din sticlă de dimensiuni cuprinzând un volum suficient de cultură pentru măsurătorile din cursul testului și permițând un transfer suficient de masă de CO<sub>2</sub> din atmosferă (a se vedea punctul 30). Trebuie reținut că volumul de lichid trebuie să fie suficient pentru efectuarea determinărilor analitice (a se vedea punctul 37).
16. În afară de acestea, pot fi necesare unele sau toate echipamentele următoare:

- Echipamente pentru cultură: se recomandă un dulap sau o încăpăre în care să se poată menține temperatura de incubație aleasă la  $\pm 2$  °C.
- Instrumente de măsurare a luminii: este important de remarcat că metoda de măsurare a intensității luminii și, în special, tipul de receptor (colector) pot influența valoarea măsurată. Măsurătorile ar trebui făcute preferabil prin folosirea unui receptor sferic ( $4\pi$ ) (care răspunde la lumina directă și reflectată provenită din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare), sau a unui receptor  $2\pi$  (care răspunde la lumina provenită din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare).
- Aparatură pentru determinarea biomasei de alge. Numărul celulelor, care este cel mai frecvent utilizat parametru înlocuitor pentru biomasa de alge, poate fi obținut prin folosirea unui contor electronic de particule, a unui microscop cu cameră de numărare sau a unui citometru de flux. Alți înlocuitori de biomasă se pot măsura folosind un citometru de flux, fluorimetru, spectrofotometru sau colorimetru. Este utilă calcularea unui factor de conversie care să stabilească relația dintre numărul de celule și greutatea uscată. Pentru a se obține rezultate utile ale măsurătorilor la concentrații scăzute de biomasă atunci când se folosește un spectrofotometru, poate fi necesară folosirea de cuve cu un traseu al razelor luminoase de cel puțin 4 cm.

**Organismele de testare**

17. Se pot folosi câteva specii de microalge și cianobacterii neatașate. S-a demonstrat că sușele enumerate în apendicele 2 sunt adecvate prin folosirea procedurii de testare specificate în această metodă de testare.
18. Dacă se folosesc alte specii, ar trebui raportate sușa și/sau originea. Trebuie să se confirme că creșterea exponențială a algelor de testare selectate poate fi menținută pe parcursul întregii perioade de testare, în condițiile predominante.

**Mediul de cultură**

19. Se recomandă două medii alternative de cultură, mediul OCDE și mediul AAP. Compozițiile acestor medii sunt prezentate în apendicele 3. Trebuie reținut că valoarea inițială a pH-ului și capacitatea de tamponare (care reglează creșterea pH-ului) pentru cele două medii sunt diferite. Prin urmare, rezultatele testelor pot fi diferite, în funcție de mediul folosit, în special în cazul testării de substanțe chimice ionizante.

**▼ M6**

20. Modificarea mediilor de cultură poate fi necesară pentru anumite scopuri, cum ar fi situațiile în care se testează metale și agenți de chelare sau la valori diferite ale pH-ului. Folosirea unui mediu modificat ar trebui descrisă în detaliu și justificată (3) (4).

**Concentrația biomasei inițiale**

21. Biomasa inițială din culturile de testare trebuie să fie egală în toate aceste culturi și suficient de scăzută pentru a permite creșterea exponențială pe parcursul întregii perioade de incubație fără riscul de epuizare a nutrienților. Biomasa inițială nu ar trebui să depășească 0,5 mg/l ca greutate uscată. Se recomandă următoarele concentrații celulare inițiale:

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : | $5 \times 10^3 - 10^4$ celule/ml |
| <i>Desmodesmus subspicatus</i>           | $2-5 \times 10^3$ celule/ml      |
| <i>Navicula pelliculosa</i>              | $10^4$ celule/ml                 |
| <i>Anabaena flos-aquae</i>               | $10^4$ celule/ml                 |
| <i>Synechococcus leopoliensis</i>        | $5 \times 10^4 - 10^5$ celule/ml |

**Concentrațiile substanței chimice de testare**

22. Intervalul de concentrație în care pot apărea efecte poate fi stabilit pe baza rezultatelor testelor de stabilire a intervalului. Pentru testul definitiv final ar trebui selectate cel puțin cinci concentrații dispuse în serie geometrică cu un factor care să nu depășească 3,2. Pentru substanțele chimice de testare care prezintă o curbă concentrație-răspuns constantă poate fi justificat un factor mai mare. Seriiile de concentrații ar trebui să acopere, de preferat, intervalul care provoacă o inhibare de 5-75 % a vitezei de creștere a algelor.

**Probe duplicat și probe de control**

23. Proiectul testului ar trebui să includă trei probe duplicat la fiecare concentrație de testare. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, proiectul testului poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și reducerea numărului de probe duplicat per concentrație. Numărul de probe de control duplicate trebuie să fie de cel puțin trei, recomandându-se să depășească de două ori numărul probelor duplicat folosite pentru fiecare concentrație de testare.
24. Pentru determinările analitice ale concentrațiilor substanței chimice de testare se poate pregăti un set separat de soluții de testare (a se vedea punctele 36 și 38).
25. Dacă se utilizează un solvent pentru solubilizarea substanței chimice de testare, în proiectul testului trebuie incluse probe de control suplimentare conținând solventul în aceeași concentrație cu cea folosită în cazul culturilor de testare.

**Pregătirea culturii de inocul**

26. În scopul adaptării algei testate la condițiile de testare și al asigurării faptului că algele se află în faza de creștere exponențială când sunt folosite pentru inocularea soluțiilor de testare, se pregătește o cultură de inocul în mediul de testare cu 2-4 zile înainte de începerea testului. Biomasa de alge ar trebui ajustată pentru a permite creșterii exponențiale să predomină în cultura de inocul până la începerea testului. Cultura de inocul trebuie incubată în aceleași condiții ca și culturile de testare. Se măsoară creșterea biomasei din cultura de inocul pentru a se verifica dacă creșterea se încadrează în

▼ **M6**

intervalul normal pentru suşa testată în condiţiile de cultură. Un exemplu al procedurii pentru cultura algelor este descris în apendicele 4. Pentru a se evita diviziunile celulare sincrone în timpul testului, poate fi necesară o a doua etapă de propagare a culturii de inocul.

**Pregătirea soluţiilor de testare**

27. Toate soluţiile de testare trebuie să conţină aceleaşi concentraţii de mediu de cultură şi de biomasă iniţială a algelor testate. Soluţiile de testare ale concentraţiilor alese se pregătesc de obicei prin amestecarea unei soluţii stoc a substanţei chimice de testare cu mediu de cultură şi cultură de inocul. De obicei, soluţiile stoc se pregătesc prin dizolvarea substanţei chimice în mediul de testare.
28. Solvenţii, cum ar fi acetona, alcoolul terţ-butilic şi dimetil-formamida, pot fi folosiţi ca soluţie vehicul pentru adăugarea în mediul de testare de substanţe chimice cu solubilitate scăzută în apă (2)(3). Concentraţia solventului nu trebuie să depăşească 100 µl/l, aceeaşi concentraţie de solvent adăugându-se în toate culturile (inclusiv în probele de control) din seria de testare.

**Incubaţia**

29. Se acoperă vasele de testare cu capace care permit trecerea aerului. Vasele se agită, după care se introduc în echipamentul pentru cultură. Este necesar ca, în timpul testului, algele să fie menţinute în suspensie şi să se faciliteze transferul de CO<sub>2</sub>. În acest scop, se vor folosi mişcări de agitare şi amestecare constante. Culturile ar trebui menţinute la o temperatură cuprinsă între 21 şi 24 °C, controlate la ± 2 °C. În cazul altor specii decât cele enumerate în apendicele 2, cum ar fi specii tropicale, pot fi adecvate temperaturi mai ridicate, cu condiţia îndeplinirii criteriilor de validitate. Se recomandă ca flacoanele să fie aşezate aleatoriu şi repositionate în fiecare zi în incubator.
30. PH-ul mediului de control nu trebuie să crească cu mai mult de 1,5 unităţi în timpul testului. În cazul metalelor şi substanţelor chimice care se ionizează parţial la un pH aproximativ egal cu pH-ul de testare, poate fi necesară limitarea devierii pH-ului în scopul obţinerii de rezultate reproductibile şi bine definite. O deviere de < 0,5 unităţi de pH este posibilă din punct de vedere tehnic şi poate fi obţinută prin asigurarea unei viteze adecvate de transfer de masă CO<sub>2</sub> din aerul înconjurător către soluţia de testare, de exemplu prin creşterea vitezei de agitare. O altă posibilitate constă în reducerea necesarului de CO<sub>2</sub> prin reducerea biomasei iniţiale sau a duratei testului.
31. Suprafaţa unde sunt incubate culturile trebuie să primească iluminare fluorescentă continuă şi uniformă, de tipul celei „alb-rece” sau „lumina zilei”. Suşele de alge şi cianobacterii sunt diferite din punctul de vedere al necesarului de lumină. Intensitatea luminii se selectează la un nivel adecvat pentru organismul de testare folosit. În cazul speciilor recomandate de alge verzi, intensitatea luminii la nivelul soluţiilor de testare se selectează în intervalul 60-120 µE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> când se măsoară în intervalul de lungimi de undă eficient din punct de vedere fotosintetic de 400-700 nm, folosindu-se un receptor corespunzător. Unele specii, în special *Anabaena flos-aquae*, cresc bine la intensităţi scăzute ale luminii şi pot fi afectate negativ la intensităţi ridicate. În cazul unor astfel de specii se selectează o intensitate luminoasă medie în intervalul 40-60 µE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>. (În cazul instrumentelor de măsurare a luminii calibrate în lux, un interval echivalent de 4 440-8 880 lucşi pentru lumină albă rece corespunde aproximativ intensităţii luminoase recomandate de 60-120 µE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>). Intensitatea luminoasă trebuie menţinută la ± 15 % de intensitatea luminoasă medie de deasupra zonei de incubaţie.

▼ **M6****Durata testului**

32. Durata normală a testului este de 72 de ore. Cu toate acestea, pot fi folosite durate mai lungi sau mai scurte ale testului, cu condiția respectării tuturor criteriilor de validitate de la punctul 11.

**Măsurători și determinări analitice**

33. Biomasa de alge din fiecare flacon se determină cel puțin o dată pe zi în timpul perioadei de testare. Dacă măsurătorile se fac pe volume mici, extrase din soluția de testare cu o pipetă, acestea nu se înlocuiesc.
34. Măsurarea biomasei are loc prin numărarea manuală a celulelor cu ajutorul unui microscop sau al unui contor electronic de particule (în funcție de numărul de celule și/sau de biovolum). Tehnici alternative, cum ar fi citometria de flux, fluorescența clorofilei *in vitro* sau *in vivo* (5) (6) sau densitatea optică, pot fi folosite dacă se demonstrează o corelație satisfăcătoare cu biomasa pentru intervalul de cantități de biomasă prezente în test.
35. PH-ul soluțiilor se măsoară la începutul și la sfârșitul testului.
36. Dacă este disponibilă o procedură analitică de determinare a substanței chimice de testare în intervalul de concentrație utilizat, soluțiile de testare ar trebui analizate pentru a fi verificate concentrațiile inițiale și menținerea concentrațiilor de expunere în timpul testului.
37. Analizarea concentrației substanței chimice de testare la începutul și la sfârșitul testului unei concentrații de testare scăzute și înalte, precum și o concentrație în jurul valorii anticipate  $EC_{50}$  pot fi suficiente în cazurile în care este probabil ca variația concentrațiilor de expunere să fie de mai puțin de 20 % față de valorile nominale din timpul testului. Analizarea tuturor concentrațiilor de testare la începutul și la sfârșitul testului este recomandată în cazul concentrațiilor care nu rămân în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală. În cazul substanțelor chimice de testare volatile, instabile sau puternic adsorbante, se recomandă recoltarea suplimentară de probe la intervale de 24 de ore în timpul perioadei de expunere în scopul definirii cu mai mare precizie a pierderii de substanță chimică de testare. Pentru aceste substanțe chimice sunt necesare probe duplicate suplimentare. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare trebuie efectuată doar în unul dintre vasele conținând probe duplicate la fiecare concentrație de testare (sau în conținutul vaselor grupate în funcție de proba duplicat).
38. Mediile de testare pregătite special pentru analiza concentrațiilor de expunere în timpul testului ar trebui tratate identic cu cele folosite pentru testare, adică ar trebui să se inoculeze cu alge și să fie incubate în condiții identice. Dacă este necesară analiza concentrației substanței chimice de testare dizolvate, se poate impune separarea algelor de mediu. Este de preferat ca separarea să aibă loc prin centrifugare la o forță gravitațională scăzută, suficientă pentru depunerea algelor.
39. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a  $\pm 20$  % din cea nominală sau măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația inițială nominală sau măsurată nu se află în limita a  $\pm 20$  %, analiza rezultatelor ar trebui să fie bazată pe media geometrică a concentrației din timpul expunerii sau pe modelele care descriu scăderea concentrației substanței chimice testate (3)(7).

**▼ M6**

40. Testul de inhibare a creșterii algelor este un sistem de testare mai dinamic decât majoritatea testelor de toxicitate acvatică pe termen scurt. Prin urmare, concentrațiile de expunere reale se pot dovedi dificil de definit, în special în cazul substanțelor chimice adsorbante testate la concentrații scăzute. În astfel de cazuri, dispariția substanței chimice de testare din soluție prin adsorbție în biomasa de alge în creștere nu înseamnă că aceasta s-a pierdut din sistemul de testare. În cursul analizării rezultatului testului, ar trebui să se verifice dacă o scădere a concentrației substanței chimice de testare în cursul testului este însoțită de o reducere a inhibării creșterii. Dacă acesta este cazul, poate fi luată în considerare aplicarea unui model adecvat de descriere a scăderii concentrației substanței chimice de testare (7). Dacă nu este cazul, analizarea rezultatelor se poate întemeia pe valorile concentrațiilor inițiale (nominale sau măsurate).

**Alte observații**

41. Observația microscopică se efectuează în scopul verificării stării normale și sănătoase a culturii de inocul și pentru observarea oricărei stări anormale a algelor (care poate fi provocată de expunerea la substanța chimică de testare) la sfârșitul testului.

**Test la valori-limită**

42. În unele condiții, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanța chimică de testare nu are efecte toxice la concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita solubilității sale în mediul de testare (oricare dintre ele este mai scăzută), se poate realiza un test la valori-limită, care presupune compararea răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analiza concentrației de expunere. Unui test la valori-limită i se aplică toate condițiile de testare și criteriile de validitate descrise anterior, cu excepția faptului că numărul de probe duplicat supuse tratamentului ar trebui să fie de cel puțin șase. Variabilele de răspuns din grupul de control și din cel supus tratamentului pot fi analizate folosind un test statistic de comparare a mediilor, cum ar fi un test t (Student). Dacă varianțele acestor două grupuri sunt inegale, ar trebui să se efectueze un test t ajustat pentru varianțe inegale.

**DATE ȘI RAPORT****Reprezentarea grafică a curbelor de creștere**

43. Biomasa din vasele de testare poate fi exprimată în unități ale parametrului înlocuitor folosit pentru măsurare (de exemplu numărul de celule, fluorescența).
44. Concentrația estimată a biomasei din culturile de testare și probele de control se prezintă sub forma unui tabel, împreună cu concentrațiile materialului de testare și perioadele de măsurare, înregistrate cu o rezoluție de cel puțin ore întregi, pentru a produce grafice ale curbelor de creștere. Ambele scări, logaritmică și liniară, pot fi utile în această primă etapă, dar scările logaritmice sunt obligatorii și, în general, prezintă mai bine variațiile modelului de creștere în timpul perioadei de testare. Trebuie reținut că creșterea exponențială este reprezentată ca o linie dreaptă când se face reprezentarea grafică la scară logaritmică, iar înclinația liniei (panta) indică viteza specifică de creștere.
45. Folosind graficele, se examinează dacă, pe parcursul întregului test, culturile de control cresc exponențial la viteza prevăzută. Se examinează critic toate punctele de date și aspectul graficelor și se verifică datele brute și procedurile pentru identificarea posibilelor erori. Se verifică, în special, orice punct de date care pare să devieze printr-o eroare sistematică. Dacă este evident că pot fi identificate erori de procedură și/sau acestea sunt considerate foarte probabile, punctul de date în cauză se marchează ca valoare excepțională și nu se include în analiza statistică ulterioară. (O



▼ **M6**

concentrație a algelor egală cu zero în unul din două sau trei vase duplicate poate arăta că vasul nu a fost inoculat corect sau nu a fost curățat corespunzător.) Motivele respingerii unui punct de date ca fiind valoare excepțională se indică în mod clar în raportul de testare. Motivele acceptate sunt numai erorile (rare) de procedură, nu simpla imprecizie. Procedurile statistice de identificare a valorilor excepționale au aplicabilitate limitată pentru acest tip de problemă și nu pot înlocui raționamentul calificat. Se preferă ca valorile excepționale (marcate ca atare) să fie reținute între punctele de date ilustrate în orice prezentare grafică sau tabelară ulterioară a datelor.

**Variabile de răspuns**

46. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testare asupra creșterii algelor. Această metodă de testare descrie două variabile de răspuns, deoarece diferitele jurisdicții au preferințe și cerințe de reglementare diferite. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile în toate jurisdicțiile, efectele se evaluează folosind ambele variabile de răspuns (a) și (b) descrise mai jos.

(a) Viteza medie specifică de creștere: această variabilă de răspuns se calculează pe baza creșterii logaritmice a biomasei în timpul perioadei de testare, exprimată pe zi.

(b) Randamentul: această variabilă de răspuns reprezintă biomasa de la sfârșitul testului minus biomasa de la începutul testului.

47. Trebuie remarcat că valorile de toxicitate calculate prin folosirea acestor două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență trebuie să fie recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile  $EC_x$  bazate pe viteza medie specifică de creștere ( $E_r C_x$ ) vor fi în general mai mari decât rezultatele bazate pe randament ( $E_y C_x$ ) în cazul în care condițiile de testare din această metodă de testare sunt respectate, ca urmare a bazei matematice a abordărilor respective. Aceasta nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic. Conceptul de viteză medie specifică de creștere se bazează pe modelul general al creșterii exponențiale a algelor în culturi nelimitate, în care toxicitatea se estimează pe baza efectelor asupra vitezei de creștere, fără a fi dependentă de nivelul absolut al vitezei specifice de creștere a probei de control, de panta curbei concentrație-răspuns sau de durata testului. Prin contrast, rezultatele bazate pe variabila de răspuns a randamentului depind de toate aceste variabile.  $E_y C_x$  depinde de viteza specifică de creștere a speciilor de alge folosite pentru fiecare test și de viteza maximă specifică de creștere, care poate varia între specii și chiar între sușe diferite de alge. Această variabilă de răspuns nu ar trebui folosită pentru compararea sensibilității la substanțe toxice între specii de alge sau chiar sușe diferite. În timp ce folosirea vitezei medii specifice de creștere în scopul estimării toxicității este preferată din punct de vedere științific, estimările de toxicitate bazate pe randament sunt de asemenea incluse în această metodă de testare pentru a satisface cerințele de reglementare actuale din unele țări.

**Viteza medie de creștere**

48. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a biomasei, pe baza ecuației pentru fiecare vas de probe de control și de probe supuse tratamentului [1]:

▼ **M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (z_i^{-1}) \quad [1],$$

unde:

$\mu_{i-j}$  este viteza medie specifică de creștere de la momentul  $i$  la momentul  $j$ ;

$X_i$  este biomasa la momentul  $i$ ;

$X_j$  este biomasa la momentul  $j$ .

Pentru fiecare grup supus tratamentului și pentru fiecare grup de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările varianței.

49. Se calculează viteza medie specifică de creștere pentru întreaga durată a testului (în mod normal, zilele 0-3), folosind biomasa inoculată nominal ca valoare inițială în locul unei valori inițiale măsurate, în acest mod obținându-se de obicei o precizie mai mare. Dacă dispozitivul folosit pentru măsurarea biomasei permite o determinare suficient de precisă a biomasei scăzute de inocul (de exemplu citometru de flux), se poate folosi concentrația măsurată a biomasei inițiale. De asemenea, se evaluează viteza de creștere pe secțiuni, calculată ca viteze specifice de creștere pentru fiecare zi din perioada testului (zilele 0-1, 1-2 și 2-3) și se examinează dacă viteza de creștere a probei de control rămâne constantă (a se vedea criteriile de validitate, punctul 11). O viteză specifică de creștere semnificativ mai scăzută în prima zi decât viteza medie specifică de creștere poate indica o fază de latență. În timp ce o fază de latență poate fi minimizată și, practic, eliminată din culturile de control prin propagarea adecvată a preculturii, o fază de latență la culturile expuse poate indica recuperarea după un stres toxic inițial sau o expunere redusă ca urmare a pierderii de substanță chimică de testare (inclusiv sorbție în biomasa de alge) după expunerea inițială. Prin urmare, viteza de creștere pe secțiuni poate fi estimată în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se manifestă în timpul perioadei de expunere. Diferențe substanțiale între viteza de creștere pe secțiuni și viteza medie de creștere indică o deviere de la creșterea exponențială constantă și impun examinarea atentă a curbelor de creștere.

50. Inhibarea procentuală a vitezei de creștere pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului se calculează pe baza ecuației [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100 \quad [2],$$

unde:

$\%I_r$  = inhibarea procentuală a vitezei specifice de creștere;

$\mu_c$  = valoarea medie a vitezei medii specifice de creștere ( $\mu$ ) în grupul de control;

$\mu_r$  = viteza medie specifică de creștere pentru proba duplicat supusă tratamentului.

51. Când se folosesc solvenți pentru pregătirea soluțiilor de testare, pentru calcularea inhibării procentuale se folosesc probele de control cu solvenți în locul probelor de control fără solvenți.

#### **Randamentul**

52. Randamentul se calculează ca biomasa de la sfârșitul testului minus biomasa de la începutul testului în cazul fiecărui vas de probe de control și probe supuse tratamentului. Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările varianței. Inhibarea procentuală a randamentului ( $\%I_y$ ) se poate calcula pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, după cum urmează:

**▼ M6**

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

unde:

$\% I_y$  = inhibarea procentuală a randamentului;

$Y_C$  = valoarea medie a randamentului la grupul de control;

$Y_T$  = valoarea randamentului pentru proba duplicat supusă tratamentului.

**Reprezentarea grafică a curbei concentrație-răspuns**

53. Se reprezintă grafic procentajul de inhibare în funcție de logaritmul concentrației substanței chimice de testare și se examinează graficul cu atenție, ignorându-se toate punctele de date care au fost indicate ca valori excepționale în prima fază. Punctele de date se unesc printr-o curbă, manual sau prin interpolare computerizată, pentru a se obține o primă impresie asupra relației concentrație-răspuns, apoi se continuă cu o metodă mai detaliată, preferabil o metodă statistică computerizată. În funcție de utilizarea prevăzută a datelor, de calitatea (precizia) și cantitatea de date, precum și de disponibilitatea instrumentelor de analiză a datelor, se poate decide (uneori, bine justificat) oprirea analizei datelor în această etapă și se citesc doar cifrele cheie  $EC_{50}$  și  $EC_{10}$  (și/sau  $EC_{20}$ ) de pe curba trasată manual (a se vedea și punctul de mai jos despre efectele stimulatorii). Motivele valide de a nu folosi o metodă statistică pot include:

- datele nu sunt adecvate pentru ca metodele computerizate să producă rezultate mai precise decât pot fi obținute prin raționament calificat – în astfel de situații, unele programe informatice pot chiar să nu producă o soluție fiabilă (iterațiile pot să nu convergă etc.);
- răspunsurile de creștere stimulatorie nu pot fi prelucrate în mod adecvat prin folosirea programelor informatice disponibile (a se vedea mai jos).

**Proceduri statistice**

54. Obiectivul este de a se obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns – de exemplu în funcția probit, logit sau unități Weibull (8), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile netede. Când se apropie de zero sau în cazul unei inhibiții totale, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (8). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se utilizează în cazul datelor binare (de exemplu date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a putea fi aplicate la datele despre creștere sau biomasă. Proceduri specifice de determinare a valorilor  $EC_x$  pe baza datelor continue se găsesc în lucrările (9), (10) și (11). Utilizarea analizei regresiei neliniare este descrisă mai amănunțit în appendicele 5.
55. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor  $EC_x$ . Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supuse tratamentului. Dacă totuși interpolarea neliniară este

▼ **M6**

difficilă sau eșuează ca urmare a datelor prea dispersate, problema poate fi ocolită prin efectuarea regresiei pe medii de grup, aceasta fiind o metodă practică de reducere a influenței valorilor excepționale suspectate. Folosirea acestei opțiuni se consemnează în raportul de testare ca abatere de la procedura normală, deoarece regresia curbei pe baza probelor duplicat individuale nu a produs un rezultat corect.

56. Estimările și limitele de încredere ale  $EC_{50}$  pot fi obținute și folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (13), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.
57. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, pentru efectele substanței chimice de testare asupra vitezei de creștere, este necesară compararea mediilor probelor supuse tratamentului folosind tehnici de analiză a varianței (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație trebuie comparată apoi cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau cel al lui Williams poate fi util în acest sens (12)(14)(15)(16)(17). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a varianței se verifică. Această evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (17). Teste adecvate sunt cel al lui Levene sau al lui Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a varianțelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea varianței este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analiza prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC se găsesc în referința (11).
58. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de abandonare a conceptului de NOEC și înlocuirea sa cu estimările punctuale  $EC_x$  bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a  $x$  pentru acest test cu alge. Un interval cuprins între 10 și 20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabila de răspuns aleasă) și se recomandă raportarea atât a  $EC_{10}$ , cât și a  $EC_{20}$ .

**Stimularea creșterii**

59. Se observă uneori o stimulare a creșterii (inhibare negativă) la concentrații scăzute. Aceasta poate rezulta fie din hormeză („stimulare toxică”), fie în urma adăugării de factori de creștere stimulatori odată cu materialul de testare în mediul minimal folosit. Trebuie reținut că adăugarea de nutrienți anorganici nu ar trebui să aibă niciun efect direct, deoarece mediul de testare ar trebui să își mențină un surplus de nutrienți pe parcursul întregului test. Stimularea cu doze scăzute poate fi ignorată de obicei în calculele  $EC_{50}$  cu excepția cazurilor când este extremă. Cu toate acestea, dacă este extremă sau trebuie să se calculeze o valoare  $EC_x$  pentru  $x$  scăzut, pot fi necesare proceduri speciale. Ștergerea răspunsurilor stimulatorii din analiza datelor ar trebui să fie evitată dacă este posibil, iar dacă software-ul disponibil de interpolare a curbei nu poate accepta o stimulare minoră, se poate utiliza interpolarea liniară cu „bootstrap”. Dacă stimularea este extremă, poate fi luată în considerare folosirea unui model hormetic (18).

**Inhibarea netoxică a creșterii**

60. Materialele de testare fotoabsorbante pot determina o reducere a vitezei de creștere, deoarece umbra reduce cantitatea de lumină disponibilă. Astfel de tipuri de efecte fizice trebuie să fie separate de efectele toxice prin modificarea condițiilor de testare, iar primele se raportează separat. Orientări în acest sens se găsesc în lucrările (2) și (3).

**RAPORTUL DE TESTARE**

61. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

**▼ M6***Substanța chimică de testare:*

- starea fizică și proprietățile fizico-chimice relevante, inclusiv limita solubilității în apă;
- datele de identificare a substanței chimice (de exemplu numărul CAS), inclusiv puritatea (impuritățile).

*Speciile folosite pentru testare:*

- sușa, furnizorul sau sursa și condițiile de cultură folosite.

*Condiții de testare:*

- data de începere a testului și durata sa;
  - descrierea proiectului testului: vasele de testare, volumele de cultură, densitatea biomasei la începutul testului;
  - compoziția mediului;
  - concentrațiile de testare și probele duplicat (de exemplu numărul de probe duplicat, numărul concentrațiilor de testare și progresia geometrică utilizată);
  - descrierea modului de preparare a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea de solvenți etc.;
  - echipamentul pentru cultură;
  - intensitatea și calitatea luminii (sursa, omogenitatea);
  - temperatura;
  - concentrațiile testate: concentrațiile de testare nominale și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice de testare în vasele de testare. Ar trebui raportate eficiența de recuperare a metodei și limita de cuantificare în matricea de testare;
  - orice abatere de la prezenta metodă de testare;
  - metoda de determinare a biomasei și dovada corelației dintre parametrul măsurat și greutatea uscată;
- Rezultatele:*
- valorile pH-ului la începutul și la sfârșitul testului, pentru toate tipurile de tratament;
  - biomasa pentru fiecare flacon la fiecare punct de măsurare și pentru fiecare metodă de măsurare a biomasei;
  - curbele de creștere (graficul biomasei în funcție de timp);
  - variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;
  - prezentarea grafică a relației concentrație-efect;

**▼ M6**

- estimările toxicității pentru variabilele de răspuns, de exemplu EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și NOEC, precum și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;
- dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);
- orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;
- orice alt efect observat, cum ar fi modificările morfologice ale algelor;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.
- (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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.
- (5) 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.
- (6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
- (7) 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.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
- (9) 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.
- (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
- (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

**▼ M6**

- (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) 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.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) 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.

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții**

În sensul prezentei metode de testare se folosesc următoarele definiții și abrevieri:

**„Biomasă”** înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație, exprimată în termenii unui volum dat; de exemplu mg alge/litru de soluție de testare. De obicei, „biomasa” se definește ca masă, dar în acest test acest cuvânt desemnează masa per volum. Tot în acest test, se măsoară de obicei înlocuitorii pentru biomasă, cum ar fi numărul de celule, fluorescența etc., iar folosirea termenului „biomasă” se referă așadar și la măsurarea acestor înlocuitori.

**„Substanță chimică”** înseamnă o substanță sau un amestec.

**„Coeficient de variație”** înseamnă o măsură adimensională a variabilității unui parametru, definită ca raportul dintre deviația standard și medie. Acesta se poate exprima și ca valoare procentuală. Coeficientul mediu de variație al vitezei medii specifice de creștere în culturile de control duplicat ar trebui calculat după cum urmează:

1. Se calculează % CV al vitezei medii specifice de creștere din vitezele de creștere zilnice/pe secțiuni la probele duplicat respective;
2. Se calculează valoarea medie a tuturor valorilor calculate la punctul 1 pentru a se obține coeficientul mediu de variație a vitezei specifice de creștere pe zi/pe secțiuni la culturile de control duplicat.

**„EC<sub>x</sub>”** înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu 50 %) a creșterii organismului de testare într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a denota o valoare EC derivată din viteza de creștere sau din randament se utilizează simbolurile „E<sub>r</sub>C” pentru viteza de creștere și „E<sub>y</sub>C” pentru randament.

**„Mediu de cultură”** înseamnă mediul de cultură complet sintetic în care cresc algele testate când sunt expuse unei substanțe chimice de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

**„Viteză de creștere”** (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere.

**„Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)”** înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la  $p < 0,05$ ) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Dacă aceste două condiții nu pot fi satisfăcute, trebuie să se furnizeze o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC).

**„Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC)”** înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

**„Variabilă de răspuns”** înseamnă o variabilă pentru estimarea toxicității, derivată din oricare dintre parametrii măsuirați care descriu biomasa prin diferite metode de calcul. În cazul prezentei metode de testare, vitezele de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din măsurarea directă a biomasei sau a oricăruia dintre înlocuitorii menționați.



**▼ M6**

**„Viteză specifică de creștere”** înseamnă o variabilă de răspuns definită ca raportul dintre diferența dintre logaritmi naturali ai unui parametru de observație (biomasa, în prezenta metodă de testare) și perioada de timp corespunzătoare.

**„Substanță chimică de testare”** înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

**„Randament”** înseamnă valoarea unei variabile de măsurare la sfârșitul perioadei de expunere minus valoarea variabilei de măsurare la începutul perioadei de expunere, pentru exprimarea creșterii biomasei în timpul testului.

▼ **M6***Apendicele 2***Sușe demonstrate ca fiind adecvate pentru test*****Alge verzi***

*Pseudokirchneriella subcapitata* (cunoscută anterior ca *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

*Desmodesmus subspicatus* (cunoscută anterior ca *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

***Diatomee***

*Navicula pelliculosa*, UTEX 664

***Cianobacterii***

*Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

*Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

**Surse de sușe**

Sușele recomandate sunt disponibile în culturi cu un singur tip de alge din următoarele colecții (în ordine alfabetică):

ATCC: American Type Culture Collection  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
SUA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa  
Institute of Freshwater Ecology,  
Windermere Laboratory  
Far Sawrey, Ambleside  
Cumbria LA22 0LP  
Regatul Unit

SAG: Collection of Algal Cultures  
Inst. Plant Physiology  
University of Göttingen  
Nikolausberger Weg 18  
37073 Göttingen  
GERMANIA

UTEX Culture Collection of Algae  
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology  
School of Biological Sciences  
the University of Texas at Austin  
Austin, Texas 78712  
SUA

## ▼ M6

## Aspectul și caracteristicile speciilor recomandate

|   | <i>P. subcapitata</i>           | <i>D. subspicatus</i>              | <i>N. pelliculosa</i>  | <i>A. flos-aquae</i>    | <i>S. leopoliensis</i> |
|---|---------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Aspect  | Curbat, celule izolate răsucite | Oval, în mare parte celule izolate | Bastonașe              | Lanțuri de celule ovale | Bastonașe              |
| Dimensiune (L × l) μm                                 | 8-14 × 2-3                      | 7-15 × 3-12                        | 7,1 × 3,7              | 4,5 × 3                 | 6 × 1                  |
| Volumul celulelor (μm <sup>3</sup> /celulă)           | 40-60 <sup>(1)</sup>            | 60-80 <sup>(1)</sup>               | 40-50 <sup>(1)</sup>   | 30-40 <sup>(1)</sup>    | 2,5 <sup>(2)</sup>     |
| Greutatea uscată a celulelor (mg/celulă)              | 2-3 × 10 <sup>-8</sup>          | 3-4 × 10 <sup>-8</sup>             | 3-4 × 10 <sup>-8</sup> | 1-2 × 10 <sup>-8</sup>  | 2-3 × 10 <sup>-9</sup> |
| Viteza de creștere <sup>(3)</sup> (zi <sup>-1</sup> ) | 1,5 -1,7                        | 1,2-1,5                            | 1,4                    | 1,1-1,4                 | 2,0-2,4                |

<sup>(1)</sup> Măsurat cu contor electronic de particule.

<sup>(2)</sup> Calculat pe baza dimensiunii.

<sup>(3)</sup> Cea mai frecvent observată viteză de creștere în mediul OCDE la o intensitate luminoasă de aprox. 70 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> și 21 °C.

#### Recomandări specifice privind cultura și manipularea speciilor de testare recomandate

##### *Pseudokirchneriella subcapitata* și *Desmodesmus subspicatus*

Aceste alge verzi sunt, în general, ușor de întreținut în diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi. În mod normal, celulele sunt solitare, iar măsurătorile densității celulelor pot fi efectuate cu ușurință folosind un contor electronic de particule sau un microscop.

##### *Anabaena flos-aquae*

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Este foarte important să nu se permită lotului de cultură să depășească faza de dezvoltare logaritmică în etapa de reînnoire, recuperarea fiind dificilă în acest stadiu.

*Anabaena flos-aquae* dezvoltă agregate de lanțuri de celule în serie. Dimensiunea acestor agregate poate varia în funcție de condițiile de cultură. Separarea acestor agregate poate fi necesară în timpul numărării la microscop sau când se folosește un contor electronic de particule pentru determinarea biomasei.

Pentru desfacerea lanțurilor în vederea reducerii variabilității numărului se poate utiliza sonicarea subșantioanelor. O sonicare mai îndelungată decât cea necesară pentru desfacerea lanțurilor în lungimi mai mici poate avea ca efect distrugerea celulelor. Intensitatea și durata sonicării trebuie să fie identice în cazul fiecărui tratament.

Se vor număra suficiente câmpuri pe hemocitometru (cel puțin 400 de celule) pentru a se compensa variabilitatea. Aceasta va ameliora fiabilitatea determinărilor microscopice ale densității.

După desfacerea lanțurilor de celule prin dezintegrare prudentă cu ultrasunete, volumul total de celule de *Anabaena* se va putea determina folosind un contor electronic de particule. Energia dezintegrării cu ultrasunete trebuie ajustată pentru a se preveni distrugerea celulelor.

Folosiți un agitator Vortex sau o metodă adecvată similară pentru a vă asigura că suspensia de alge utilizată pentru inocularea vaselor de testare este bine amestecată și omogenă.

▼ **M6**

Vasele de testare se așează pe o masă de agitare orbitală sau oscilantă la aproximativ 150 de rotații pe minut. În mod alternativ, tendința *Anabaena* de a se agrega poate fi prevenită prin agitare intermitentă. Dacă se produce agregarea, eșantioanele reprezentative pentru măsurătorile de biomasă trebuie selectate cu atenție. Poate fi necesară agitarea cu putere înainte de recoltarea probelor pentru a dezintegra agregatele de alge.

***Synechococcus leopoliensis***

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi.

*Synechococcus leopoliensis* crește sub formă de celule solitare în formă de bastonașe. Celulele sunt foarte mici, ceea ce îngreunează numărarea acestora la microscop în scopul măsurării biomasei. Sunt utile contoarele electronice de particule calibrate pentru numărarea particulelor cu o dimensiune de aproximativ 1 μm. Se pot folosi, de asemenea, măsurători fluorometrice *in vitro*.

***Navicula pelliculosa***

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi. A se avea în vedere că în mediu este necesară prezența silicatlui.

*Navicula pelliculosa* poate forma agregate în anumite condiții de creștere. Ca urmare a producției de lipide, celulele algelor tind uneori să se acumuleze în pelicula de suprafață. În această situație, se vor adopta măsuri speciale pentru obținerea de eșantioane reprezentative când se recoltează subeșantioane pentru determinarea biomasei. Poate fi necesară agitarea cu putere, de exemplu, cu ajutorul unui agitator Vortex.

▼ **M6***Apendicele 3***Medii de cultură**

Se poate folosi unul dintre următoarele două medii de cultură:

— mediul OCDE: mediul original al Orientării OCDE privind testarea nr. 201, conform și cu ISO 8692;

— mediul AAP al EPA SUA, conform și cu ASTM.

Pentru pregătirea acestor medii se folosesc reactivi sau substanțe chimice de puritate analitică și apă deionizată.

**Compoziția mediului AAP (EPA SUA) și a mediului conform cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 201.**

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

Raportul molar EDTA/fier depășește ușor unitatea. Aceasta previne precipitarea fierului și, în același timp, este minimizată chelarea ionilor de metale grele.

În testul cu diatomeea *Navicula pelliculosa*, ambele medii trebuie să fie suplimentate cu Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O pentru a se obține o concentrație de 1,4 mg Si/l.

**▼ M6**

PH-ul mediului se obține la echilibrul dintre sistemul carbonat al mediului și presiunea parțială a CO<sub>2</sub> în aerul atmosferic. O relație aproximativă între pH la 25 °C și concentrația molară a bicarbonatului este:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3]$$

Cu 15 mg NaHCO<sub>3</sub>/l,  $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$  (mediul EPA SUA) și cu 50 mg NaHCO<sub>3</sub>/l,  $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$  (mediul OCDE).

**Compoziția elementară a mediilor de testare**

| Element | AAP    | OCDE   |
|---------|--------|--------|
|         | 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  |

**Pregătirea mediului OCDE**

| Nutrient                                 | Concentrația în soluția stoc |
|--|------------------------------|
| Soluția stoc nr. 1:<br>macronutrienți    |                              |
| NH <sub>4</sub> Cl                       | 1,5 g/l                      |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O    | 1,2 g/l                      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O    | 1,8 g/l                      |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O    | 1,5 g/l                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>          | 0,16 g/l                     |
| Soluția stoc nr. 2:<br>fier              |                              |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O    | 64 mg/l                      |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O | 100 mg/l                     |
| Soluția stoc nr. 3:<br>microelemente     |                              |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>           | 185 mg/l                     |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O    | 415 mg/l                     |
| ZnCl <sub>2</sub>                        | 3 mg/l                       |

▼ **M6**

| Nutrient  | Concentrația în soluția stoc |
|---|------------------------------|
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 1,5 mg/l                     |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,01 mg/l                    |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 7 mg/l                       |
| Soluția stoc nr. 4:<br>bicarbonat                   |                              |
| $\text{NaHCO}_3$                                    | 50 g/l                       |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ |                              |

Soluțiile stoc se sterilizează prin filtrarea prin membrană (diametrul mediu al porilor 0,2  $\mu\text{m}$ ) sau în autoclavă (120 °C, 15 min). Soluțiile se depozitează la întuneric la 4 °C.

Soluțiile stoc nr. 2 și 4 nu se sterilizează în autoclavă, ci doar prin filtrarea prin membrană.

Se pregătește un mediu de cultură prin adăugarea unui volum adecvat al soluțiilor stoc 1-4 în apă:

Se adaugă în 500 ml de apă sterilizată:

10 ml de soluție stoc nr. 1

1 ml de soluție stoc nr. 2

1 ml de soluție stoc nr. 3

1 ml de soluție stoc nr. 4

Se completează până la 1 000 ml cu apă sterilizată.

Se lasă suficient timp pentru echilibrarea mediului cu  $\text{CO}_2$  atmosferic, prin barbotare timp de câteva ore cu aer steril filtrat, dacă este necesar.

#### **Pregătirea mediului EPA SUA**

1. Se adaugă 1 ml din fiecare soluție stoc în 2.1–2.7 la aproximativ 900 ml de apă deionizată sau distilată, apoi se diluează la 1 l.
2. Soluțiile stoc de macronutrienți se obțin prin dizolvarea următoarelor substanțe în 500 ml de apă deionizată sau distilată. Reactivii 2.1, 2.2, 2.3, și 2.4 pot fi combinați într-o singură soluție stoc.

|     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 2.1 | $\text{NaNO}_3$  | 12,750 g.          |
| 2.2 | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$              | 6,082 g.           |
| 2.3 | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$              | 2,205 g.           |
| 2.4 | Soluție stoc de macronutrienți (a se vedea punctul 3). |                    |
| 2.5 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$              | 7,350 g.           |
| 2.6 | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                               | 0,522 g.           |
| 2.7 | $\text{NaHCO}_3$                                       | 7,500 g.           |
| 2.8 | $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$    | A se vedea nota 1. |

**▼ M6**

*Nota 1:* Se folosește exclusiv pentru speciile de diatomee folosite pentru testare. Se poate adăuga direct (202,4 mg) sau prin soluția stoc, pentru a rezulta 20 mg/l Si concentrație finală în mediu.

3. Soluția stoc de micronutrienți se obține prin dizolvarea următoarelor substanțe în 500 ml de apă deionizată sau distilată:

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 3.1 | $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 92,760 mg.  |
| 3.2 | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 207,690 mg.   |
| 3.3 | $\text{ZnCl}_2$                                     | 1,635 mg.   |
| 3.4 | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 79,880 mg.  |
| 3.5 | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0,714 mg.   |
| 3.6 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 3,630 mg.   |
| 3.7 | $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,006 mg.   |
| 3.8 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | 150,000 mg. [(etilendinitrilo)tetraacetat disodiu]. |
| 3.9 | $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,005 mg A se vedea nota 2.                         |

*Nota 2:* Se folosește exclusiv pentru culturile stoc ale speciilor de diatomee.

4. Se ajustează pH-ul la  $7,5 \pm 0,1$  cu 0,1 N sau 1,0 N NaOH sau HCl.
5. Se filtrează mediul într-un recipient steril printr-un filtru cu membrană de 0,22  $\mu\text{m}$ , dacă se folosește un contor de particule, sau printr-un filtru de 0,45  $\mu\text{m}$ , dacă nu se folosește un contor de particule.
6. Mediul se depozitează la întuneric la aproximativ 4 °C până la utilizare.



▼ **M6***Apendicele 4***Exemplu de procedură pentru cultura de alge****Observații generale**

Scopul cultivării pe baza procedurii de mai jos este acela de a obține culturi de alge pentru testele de toxicitate.

Trebuie folosite metode adecvate pentru a garanta lipsa infectării cu bacterii a culturilor de alge. Se recomandă culturile axenice, dar se stabilesc și se folosesc culturile cu un singur tip de alge.

Toate operațiile se efectuează în condiții sterile pentru a evita contaminarea cu bacterii și alte alge.

**Echipamente și materiale**

A se vedea metoda de testare: „Aparatură”.

**Proceduri pentru obținerea culturilor de alge***Prepararea soluțiilor nutritive (mediilor):*

Toate sărurile nutritive ale mediului se prepară ca soluții stoc concentrate și se păstrează la rece și întuneric. Aceste soluții se sterilizează prin filtrare sau în autoclavă.

Mediul se prepară prin adăugarea cantității corecte de soluție stoc în apa distilată sterilă, acordându-se atenție prevenirii infecțiilor. Pentru mediul solid se adaugă 0,8 % agar.

*Cultura stoc:*

Culturile stoc sunt culturi mici de alge care se transferă cu regularitate într-un mediu proaspăt pentru a acționa ca material inițial de testare. Dacă nu sunt folosite cu regularitate, se scurg pe tuburile înclinate acoperite cu agar. Culturile se transferă într-un mediu proaspăt cel puțin o dată la două luni.

Culturile stoc se cresc în flacoane conice care conțin mediul corespunzător (volum de cca 100 ml). Când algele sunt incubate la 20 °C cu iluminare continuă, este necesar un transfer săptămânal.

În timpul transferului, o cantitate din cultura „veche” se transferă cu pipete sterile într-un flacon cu mediu proaspăt, astfel încât, în cazul speciilor cu creștere rapidă, concentrația inițială să fie de cca 100 de ori mai mică decât în cultura veche.

Viteza de creștere a unei specii se poate determina din curba de creștere. Dacă aceasta se cunoaște, este posibil să se estimeze densitatea la care cultura ar trebui transferată într-un mediu nou. Acest lucru trebuie făcut înainte ca algele din cultură să atingă faza morții.

*Precultura:*

Precultura are ca scop obținerea unei cantități de alge adecvate pentru inocularea culturilor de testare. Precultura se incubează în condițiile testării și se folosește în timpul creșterii exponențiale, în mod normal după o perioadă de incubare de 2-4 zile. Când culturile de alge conțin celule deformate sau anormale, acestea trebuie înlăturate.

▼ **M6***Apendicele 5***Analiza datelor prin metoda regresiei neliniare****Considerații generale**

Răspunsul la testele pe alge și alte teste de creștere microbiană – în mod natural, creșterea biomasei este o variabilă continuă sau metrică – o viteză de proces, dacă se folosește viteza de creștere, și integrala sa în funcție de timp, dacă se selectează biomasa. Ambele fac trimitere la răspunsul mediu corespunzător al probelor de control duplicate neexpuse care manifestă un răspuns maxim pentru condițiile impuse – lumina și temperatura fiind principalii factori determinanți în testul pe alge. Sistemul este distribuit sau omogen, iar biomasa poate fi considerată ca fiind un continuum fără a se ține cont de celulele individuale. Distribuția varianței tipului de răspuns pentru un astfel de sistem are legătură exclusiv cu factorii experimentali (descriși în mod obișnuit de distribuțiile log-normale sau normale ale erorilor). Aceasta este în contrast cu răspunsurile tipice din cadrul biotestului cu date binare, pentru care toleranța (distribuită de obicei binomial) a organismelor individuale este adesea presupusă a fi componenta dominantă a varianței. Răspunsurile de control sunt, în acest caz, zero sau nivel de fond.

În situația necomplicată, răspunsul normalizat sau relativ,  $r$ , descrește uniform de la 1 (inhibare zero) la 0 (100 % inhibare). Este de reținut faptul că toate răspunsurile au o marjă de eroare aferentă și că inhibările aparent negative pot fi calculate doar ca rezultat al unei erori aleatorii.

**Analiza regresiei***Modele*

Obiectivul unei analize a regresiei este de a descrie cantitativ curba concentrație-răspuns sub forma unei funcții matematice de regresie  $Y = f(C)$  sau, mai frecvent,  $F(Z)$ , unde  $Z = \log C$ . Folosită invers,  $C = f^{-1}(Y)$  permite calcularea valorilor  $EC_x$ , inclusiv  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$  și  $EC_{20}$  și limitele lor de încredere de 95 %. Câteva formule funcționale matematice simple au demonstrat că pot descrie cu succes relațiile concentrație-răspuns obținute în testele de inhibare a creșterii algelor. Funcțiile includ, de exemplu, ecuația logistică, ecuația Weibull nesimetrică și funcția de distribuție log-normală, toate acestea fiind curbe sigmoide care se apropie asimptotic de 0 pentru  $C \rightarrow 0$  și de 1 pentru  $C \rightarrow \text{infin}$ .

Folosirea modelelor funcției-limită continue (de exemplu modelul Kooijman „de inhibare a creșterii populațiilor”, Kooijman et al. 1996) este o alternativă propusă recent la modelele asimptotice. Acest model nu presupune efecte la concentrații sub o anumită limită  $EC_0 +$ , care se estimează prin extrapolarea relației concentrație-răspuns pentru a intersecta axa concentrației prin folosirea unei funcții continue simple care nu este diferențiabilă în punctul de pornire.

Trebuie reținut că analiza poate consta într-o simplă minimizare a sumelor pătratelor reziduale (presupunând că varianța este constantă) sau a pătratelor ponderate, dacă eterogenitatea varianței este compensată.

*Procedura*

Procedura poate fi descrisă după cum urmează: se selectează o ecuație funcțională adecvată  $Y = f(C)$  și se ajustează la date prin regresie neliniară. Se preferă folosirea măsurătorilor pentru fiecare flacon individual, și nu valorile medii ale probelor duplicate, pentru a se obține din date cât mai multe informații

## ▼ M6

posibil. Dacă, pe de altă parte, varianța este mare, experiența practică arată că valorile medii ale probelor duplicate pot asigura o estimare matematică mai precisă, mai puțin influențată de erorile sistematice ale datelor decât în cazul fiecărui punct de date reținut.

Se reprezintă grafic curba ajustată și datele măsurate și se examinează dacă ajustarea curbei este adecvată. Analiza valorilor reziduale poate fi un instrument deosebit de util în acest scop. Dacă relația funcțională aleasă pentru ajustarea relației concentrație-răspuns nu descrie în mod corect întreaga curbă sau o parte esențială a acesteia, cum ar fi răspunsul la concentrații scăzute, se alege altă opțiune de ajustare a curbei – de exemplu, o curbă asimetrică, cum ar fi funcția Weibull, în locul uneia simetrice. Inhibările negative pot fi o problemă pentru funcția de distribuție log-normală, de exemplu, fiind necesară și în acest caz o funcție de regresie alternativă. Nu se recomandă atribuirea valorii zero sau a unei valori pozitive mici unor astfel de valori negative, deoarece aceasta distorsionează distribuția erorilor. În scopul estimării valorilor  $EC_{x \text{ scăzut}}$ , se poate dovedi utilă trasarea de ajustări separate ale curbei pe părți ale acesteia, cum ar fi partea de inhibare scăzută. Se calculează pe baza ecuației ajustate [prin „estimare inversă”,  $C = f^{-1}(Y)$ ] estimările punctuale caracteristice ale  $EC_x$  și se raportează  $EC_{50}$  ca minim și una sau două estimări  $EC_{x \text{ scăzut}}$ . Experiența dobândită în urma testării practice a arătat că precizia testului pe alge permite, în mod normal, o estimare suficient de precisă la un nivel de inhibare de 10 %, dacă punctele de date sunt suficiente – cu excepția situațiilor când stimularea are loc la concentrații scăzute, ca factor de confuzie. Precizia unei estimări a  $EC_{20}$  este adesea considerabil mai bună decât cea a unui  $EC_{10}$ , deoarece  $EC_{20}$  este poziționat de obicei pe partea aproximativ liniară a curbei concentrație-răspuns centrale. Uneori,  $EC_{10}$  poate fi dificil de interpretat ca urmare a stimulării creșterii. Astfel, chiar dacă  $EC_{10}$  poate fi obținut, în mod normal, cu suficientă precizie, se recomandă să se raporteze întotdeauna și  $EC_{20}$ .

#### Factori de ponderare

Varianța experimentală nu este în general constantă și include de obicei o componentă proporțională, aplicarea unei regresii ponderate permanente fiind, prin urmare, avantajoasă. Factorii de ponderare pentru o astfel de analiză sunt dați de obicei invers proporțional cu varianța:

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

Multe programe de regresie includ opțiunea de analiză de regresie ponderată, factorii de ponderare fiind enumerați într-un tabel. Pentru simplificare, factorii de ponderare se normalizează prin multiplicarea lor cu  $n/\sum w_i$  ( $n$  este numărul punctelor de date), astfel încât suma lor să fie egală cu 1.

#### Răspunsuri de normalizare

Normalizarea prin răspunsul mediu de control ridică unele probleme de principiu și determină apariția unei structuri a varianței destul de complicate. La împărțirea răspunsurilor la răspunsul mediu de control, în scopul obținerii procentajului de inhibare, se introduce o eroare suplimentară cauzată de eroarea pentru media de control. Cu excepția cazului în care această eroare este neglijabilă, factorii de ponderare din regresie și limitele de încredere se corectează pentru covarianța cu proba de control (Draper și Smith, 1981). Este de reținut faptul că precizia înaltă pe răspunsul mediu de control estimat este importantă pentru minimizarea varianței generale pentru răspunsul relativ. Această varianță este descrisă mai jos:

(Indicele  $i$  se referă la nivelul concentrației  $i$ , iar indicele 0 se referă la probele de control.)

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

▼ **M6**

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

și întrucât  $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$  și  $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

cu date distribuite normal și probe duplicat  $m_i$  și  $m_0$ :  $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

varianța totală a răspunsului relativ  $Y_i$  devine astfel:

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

Eroarea pe media de control este invers proporțională cu rădăcina pătrată a numărului de probe de control duplicate exprimat ca medie, uneori fiind justificată introducerea de date anterioare în scopul reducerii considerabile în acest fel a erorii. O procedură alternativă este de a nu normaliza datele și de a ajusta răspunsurile absolute, inclusiv datele despre răspunsul de control, introducând însă valoarea răspunsului de control ca parametru adițional care urmează să fie ajustat prin regresie neliniară. Cu o ecuație obișnuită de regresie cu 2 parametri, această metodă impune ajustarea a 3 parametri, necesitând prin urmare mai multe puncte de date decât regresia neliniară pe date care sunt normalizate prin folosirea unui răspuns de control prestabilit.

#### *Intervale de încredere inverse*

Calcularea intervalelor de încredere ale regresiei neliniare prin estimare inversă este destul de complexă, nefiind inclusă ca dotare standard în pachetele de programe informatice uzuale de statistică. Limitele de încredere aproximative pot fi obținute cu ajutorul programelor standard de regresie neliniară cu reparametrizare (Bruce și Versteeg, 1992), care presupune rescrierea ecuației matematice cu estimările punctuale dorite, de exemplu  $EC_{10}$  și  $EC_{50}$  ca parametri de estimat. (Fie funcția  $I = f(\alpha, \beta, \text{concentrație})$  și se folosesc relațiile de definiție  $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$  și  $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$  pentru a substitui  $f(\alpha, \beta, \text{concentrație})$  cu o funcție echivalentă  $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{concentrație})$ ).

Un calcul mai direct (Andersen et al., 1998) se efectuează prin reținerea ecuației originale și folosirea unei expansiuni Taylor în jurul mediilor  $r_i$  și  $r_0$ .

În ultimul timp au devenit populare „metodele bootstrap”. Aceste metode folosesc datele măsurate și reeșantionarea frecventă cu ajutorul unui generator de numere aleatorii pentru a estima o distribuție empirică a varianței.

#### **BIBLIOGRAFIE**

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

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D. și Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. 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.



#### C.4. DETERMINAREA BIODEGRADABILITĂȚII „RAPIDE”

##### PARTEA I. CONSIDERAȚII GENERALE

##### I.1. INTRODUCERE

Sunt descrise șase metode de testare care permit trierea substanțelor chimice pentru biodegradabilitate rapidă în mediul apos aerob:

- (a) Epuizarea Carbonului Organic Dizolvat (COD) (Metoda C.4-A)
- (b) Test de screening OCDE – Epuizarea COD (Metoda C.4-B)
- (c) Degajarea bioxidului de carbon (CO<sub>2</sub>) (Testul modificat Sturm) (Metoda C.4-C)
- (d) Respirimetrie manometrică (Metoda C.4-D)
- (e) Vas închis (Metoda C.4-E)
- (f) MITI (Ministerul Comerțului și Industriei Internaționale – Japonia) (Metoda C.4-F)

Considerațiile generale și comune privind cele șase teste sunt prezentate în partea I a metodei. Aspectele specifice metodelor individuale sunt prezentate în părțile II-VII. Apendicele conțin definiții, formule și material orientativ.

Un test interlaboratoare OCDE, efectuat în 1988 ca exercițiu de comparabilitate, a arătat că metodele dau rezultate compatibile. Cu toate acestea, în funcție de caracteristicile fizice ale substanței ce urmează a fi testată, poate fi preferată o metodă sau alta.

##### I.2. ALEGEREA METODEI ADECVATE

Pentru a alege cea mai adecvată metodă, sunt necesare informații legate de solubilitatea substanței chimice, presiunea de vaporii și caracteristicile de adsorbție. Structura sau formula chimică trebuie cunoscute pentru a calcula valorile teoretice și/sau a verifica valorile determinate ale parametrilor, de exemplu, CTO, CO<sub>2</sub>T, COD, COT, CCO (a se vedea apendicele 1 și 2).

Substanțele de testat care sunt solubile în apă până la cel puțin 100 mg/l pot fi evaluate prin toate metodele, cu condiția ca ele să fie nevolatile și neadsorbante. Pentru substanțele chimice care sunt greu solubile în apă, volatile sau adsorbante, metodele adecvate sunt indicate în tabelul 1 și descrise în apendicele 3. Substanțele chimice cu volatilitate moderată pot fi testate prin metoda epuizării COD, dacă există destul spațiu pentru gaz în vasele de testare (care trebuie să aibă dopuri adecvate). În acest caz, se pregătește și un martor abiotic care să permită urmărirea pierderilor de masă.



Tabelul 1

## Aplicabilitatea metodelor de testare

| Test                      | Metoda analitică                            | Adecvare la substanțele care sunt: |          |            |
|---------------------------|---|------------------------------------|----------|------------|
|                           |   | greu solubile                      | volatile | adsorbante |
| Epuizare COD              | Carbon organic dizolvat                     | —                                  | —        | +/-        |
| Epuizare OCDE modificată  | Carbon organic dizolvat                     | —                                  | —        | +/-        |
| Degajarea CO <sub>2</sub> | Respirometrie: degajarea CO <sub>2</sub>    | +                                  | —        | +          |
| Respirometrie manometrică | Respirometrie manometrică: consum de oxigen | +                                  | +/-      | +          |
| Vas închis                | Respirometrie: oxigen dizolvat              | +/-                                | +        | +          |
| MITI                      | Respirometrie: consum de oxigen             | +                                  | +/-      | +          |

Sunt necesare informații legate de puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale compusului de testat pentru a interpreta rezultatele obținute, în special când rezultatele au valori mici sau marginale.

Informațiile legate de toxicitatea substanței față de bacterii (apendicele 4) sunt foarte folositoare pentru alegerea concentrațiilor și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor scăzute de biodegradare.

## I.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Pentru a verifica metoda, se testează substanțe de referință care îndeplinesc criteriile de biodegradabilitate rapidă într-un flacon adecvat în paralel cu testele propriu-zise.

Substanțele chimice adecvate sunt anilina (proaspăt distilată), acetatul de sodiu și benzoatul de sodiu. Toate aceste substanțe chimice de referință se degradează în condițiile de lucru din prezentele metode, chiar și când nu se adaugă deliberat inocul.

S-a sugerat faptul că trebuie găsită o substanță chimică de referință ușor degradabilă, dar care să necesite adăugarea unui inocul. S-a propus ftalatul acid de potasiu, însă este nevoie de obținerea mai multor dovezi în cazul acestei substanțe înainte ca ea să fie acceptată ca substanță de referință.

La testele de respirometrie, compușii care conțin azot pot afecta consumul de oxigen din cauza nitrificării (a se vedea apendicele 2 și 5).

## I.4. PRINCIPIUL METODELOR DE TESTARE

O soluție sau suspensie a substanței de testat în mediu mineral este inoculată și incubată în condiții aerobe la întuneric sau lumină difuză. Cantitatea de COD datorată inoculului în soluție trebuie să fie menținută la valori cât mai mici posibile în comparație cu cantitatea de COD datorată substanței de testat. Activitatea endogenă a inoculului este cuantificată făcând teste martor paralele, cu inocul și fără substanță de testat, deși activitatea endogenă a celulelor în prezența substanței nu se suprapune exact peste activitatea endogenă a martorului. În paralel se testează o substanță de referință pentru a controla funcționarea modului de operare.

**▼B**

În general, degradarea este urmată de determinarea parametrilor, cum ar fi COD, generarea de CO<sub>2</sub> și consumul de oxigen, iar măsurătorile se fac la intervale destul de scurte, pentru a permite identificarea momentului de începere și terminare a biodegradării. Cu respirometre automate măsurarea se efectuează continuu. COD se măsoară uneori alături de un alt parametru, dar acest lucru se face în mod obișnuit numai la începutul și sfârșitul testării. De asemenea, se poate folosi o analiză chimică specifică pentru a estima degradarea primară a substanței de testat și pentru a se determina concentrația substanțelor intermediare formate (obligatoriu în testul MITI).

În mod normal, testul durează 28 zile. Cu toate acestea, testele se pot încheia înainte de 28 zile, adică de îndată ce curba biodegradării se aplatizează pentru cel puțin 3 determinări. Testele se pot, de asemenea, prelungi peste 28 zile, când curba arată că biodegradarea a început, dar că nu s-a ajuns la aplatizare în a 28-a zi.

## I.5. CRITERII DE CALITATE

### I.5.1. Reproductibilitate

Data fiind natura biodegradării și a culturilor bacteriene mixte folosite ca inoculi, determinările se fac cel puțin în duplicat.

S-a observat experimental că la o concentrație mai mare de microorganisme adăugate inițial în mediul de testare variațiile între replici sunt mai mici. Testele interlaboratoare au arătat, de asemenea, că pot exista mari variații între rezultatele obținute de diferite laboratoare, dar că se poate ajunge la o armonizare acceptabilă în cazul compușilor ușor biodegradabili.

### I.5.2. Validitatea testului

Testul se consideră validat dacă diferența dintre valorile extreme reprezentând gradul de îndepărtare al substanței la momentul aplatizării curbelor de biodegradare ale replicilor este mai mică de 20 % fie la sfârșitul testului, fie la începutul fereștii de 10 zile, după caz, și dacă procentul de degradare a substanței de referință a atins nivelul de biodegradabilitate rapidă în 14 zile. Dacă nu este întrunită niciuna din aceste condiții, testul se repetă. Data fiind rigoarea metodelor, valorile scăzute nu înseamnă în mod necesar că substanța de testat nu este biodegradabilă în condiții de mediu, ci că sunt necesare alte studii pentru a determina biodegradabilitatea.

Dacă într-un test de toxicitate care conține atât substanța de testat, cât și o substanță chimică de referință are loc mai puțin de 35 % degradare (bazat pe COD) sau mai puțin de 25 % (bazat pe CTO sau CO<sub>2</sub>T) în 14 zile, se poate presupune că substanța de testat este inhibitoare (a se vedea și apendicele 4). Seria de teste se repetă, dacă este posibil folosind o concentrație mai scăzută a substanței de testat și/sau o concentrație mai ridicată a inoculului, dar nu mai mult de 30 mg solide/litru.

## I.6. MOD DE OPERARE GENERAL ȘI PREGĂTIRI

Condițiile generale aplicabile testelor sunt rezumate în tabelul 2. Aparatura și alte condiții de testare legate în mod specific de un anumit test sunt descrise în subcapitolul destinat testului respectiv.



Tabelul 2

## Condiții de testare

| Test  | Epuizare COD  | Eliminare CO <sub>2</sub> | Respirometrie manometrică | Test de screening OCDE                      | Vas închis   | MITI (l)                                       |
|---|---|---------------------------|---------------------------|---|--|--|
| Concentrația substanței de testat                   |   |                           |                           |   |  |  |
| în mg/l   |   |                           | 100                       |   | 2-10   | 100  |
| mg COD/l  | 10-40   | 10-20                     |                           | 10-40                                       |  |  |
| mg CTO/l  |   |                           | 50-100                    |   | 5-10   |  |
| Concentrația inoculului (în celule/l, aprox.)       | ≤ 30 mg/l SS sau ≤ 100 ml efluent/l (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> ) |                           |                           | 0,5ml efluent secundar/l (10 <sup>5</sup> ) | ≤ 5 ml efluent/l (10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> ) | 30 mg/l SS (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> ) |
| Concentrația elementelor în mediu mineral (în mg/l) |   |                           |                           |   |  |  |
| P   | 116   |                           |                           |   | 11,6   | 29   |
| N   | 1,3   |                           |                           |   | 0,13   | 1,3  |
| Na  | 86  |                           |                           |   | 8,6  | 17,2   |
| K   | 122   |                           |                           |   | 12,2   | 36,5   |
| Mg  | 2,2   |                           |                           |   | 2,2  | 6,6  |
| Ca  | 9,9   |                           |                           |   | 9,9  | 29,7   |
| Fe  | 0,05 - 0,1  |                           |                           |   | 0,05 - 0,1   | 0,15   |
| pH  | 7,4 ± 0,2   |                           |                           |   |  | De preferință 7,0                              |
| temperatură   | 22 ± 2 °C   |                           |                           |   |  | 25 ± 1 °C                                      |

COD = carbon organic dizolvat

CTO = cerere teoretică de oxigen

SS = materii solide în suspensie

## I.6.1. Apa de diluție

Se folosește apa deionizată sau distilată fără concentrații inhibitoare de substanțe toxice (de exemplu, ioni de Cu<sup>++</sup>). Compusul de testat trebuie să nu contribuie cu mai mult de 10 % la conținutul de carbon organic al apei. Pentru a elimina valorile ridicate ale probei martor este necesar ca apa de testare să aibă o puritate ridicată. Contaminarea poate rezulta din impuritățile inerente și din rășinile schimbătoare de ioni și material provenit din liza de bacterii și alge. Pentru fiecare serie tratată se folosește numai o șarjă de apă, verificată înainte prin analiza COD. O astfel de verificare nu este necesară pentru testul în vas flacon închis, dar consumul de oxigen al apei trebuie să fie scăzut.



**▼B****I.6.2. Soluțiile mamă ale componentelor minerale**

Pentru a prepara soluțiile de testare se prepară soluțiile mamă ale componentelor minerale, cu concentrațiile adecvate. Se pot folosi următoarele soluții mamă (cu factori de diluție diferiți) pentru metodele: epuizare COD, test de screening modificat OCDE, eliminare CO<sub>2</sub>, respirometrie manometrică, testul în vas închis.

Factorii de diluție și, pentru testul MITI, pregătirea specifică a mediului mineral, sunt prezentate în capitolele referitoare la testele respective.

*Soluțiile mamă:*

Se prepară următoarele soluții mamă folosind reactivi de puritate analitică:

(a) ortofosfat diacid de potasiu, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,50 g

ortofosfat acid de potasiu, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21,75 g

ortofosfat acid de sodiu dihidrat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 33,40 g

clorură de amoniu, NH<sub>4</sub>Cl 0,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru. pH-ul soluției este 7,4.

(b) clorură de calciu, anhidră, CaCl<sub>2</sub> 27,50 g

sau clorură de calciu dihidrat, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 36,40 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru

(c) sulfat de magneziu heptahidrat, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

(d) clorură ferică (III) hexahidrat, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,25 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

Notă: Pentru a evita prepararea acestei soluții imediat înainte de folosire, se adaugă o picătură de HCl concentrat sau 0,4 g sare disodică a acidului etilendiamin-tetraacetic (EDTA) pe litru.

**I.6.3. Soluții mamă ale substanțelor chimice**

De exemplu, 1-10 g de substanță de testat sau de referință se dizolvă în apă deionizată și se completează până la 1 litru, când solubilitatea depășește 1 g/l. În caz contrar, soluțiile mamă se prepară în mediu mineral sau se adaugă substanța de testat direct în mediul mineral. Pentru manevrarea substanțelor chimice mai puțin solubile, a se vedea apendicele 3, dar în testul MITI (Metoda C.4-F), nu se folosesc nici solvenți și nici agenți de emulsionare.

## ▼B

I.6.4. **Inocul**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: nămol activ, efluenți uzați (neclorinați), ape de suprafață și soluri sau dintr-un amestec al acestora. Pentru testele de epuizare COD, eliminarea CO<sub>2</sub> și respirometrie manometrică, dacă se folosește nămol activ, acesta se ia dintr-o instalație de tratare sau o instalație de laborator care primește predominant ape reziduale menajere. S-a constatat că inoculi din alte surse dau rezultate foarte difuze. Pentru testul de screening modificat OCDE și testul în vas închis, este nevoie de un inocul mai diluat, fără agregate floclate de nămol, iar sursa preferată este un efluent secundar dintr-o instalație industrială sau de laborator pentru tratarea apei reziduale menajere. În testele MITI inoculul provine dintr-un amestec de surse și este descris în capitolul testului respectiv.

I.6.4.1. *Inocul din nămoluri active*

Se prelevează o probă de nămol activ proaspăt din bazinul de aerare al unei instalații de tratare ape reziduale sau dintr-o instalație de laborator care tratează în special apele reziduale menajere. Se îndepărtează particulele grosiere dacă este necesar, prin filtrare printr-o sită fină, apoi nămolul se menține în condiții aerobe.

Ca alternativă, se lasă la decantat sau se centrifughează proba (de exemplu, la 1 100 rot./min timp de 10 minute) după îndepărtarea tuturor particulelor grosiere. Se îndepărtează stratul de supernatant. Nămolul se spală în mediu mineral. Se prepară o suspensie de nămol concentrat în mediu mineral pentru a obține o concentrație de 3-5 g solide în suspensie/l și se aerează până în momentul folosirii.

Nămolul este prelevat dintr-o instalație clasică, care funcționează corect. Dacă nămolul provine dintr-o instalație de tratare cu debit mare sau se presupune că ar conține inhibitori, trebuie spălat. După o amestecare puternică, se lasă la decantat sau se centrifughează nămolul din noua suspensie, apoi se îndepărtează supernatantul; nămolul spălat se trece din nou în suspensie într-un alt volum de mediu mineral. Se repetă această procedură până când se consideră că nămolul nu mai conține substrat sau inhibitori în exces.

Imediat înainte de folosire, se prelevează o probă după ce nămolul este suspensionat complet sau, după caz, din nămol netratat, pentru a determina greutatea uscată a solidelor în suspensie.

O altă alternativă de obținere a inoculului este de a omogeniza nămolul activ (3-5 g solide în suspensie/l) într-un amestecător mecanic două minute la viteză medie; se lasă apoi timp de 30 minute, sau mai mult dacă este nevoie, la decantat și se prelevează supernatantul pentru a fi folosit ca inocul într-un raport de 10 ml/l de mediu mineral.

I.6.4.2. *Alte surse de inocul*

Inoculul se poate obține din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care se alimentează mai ales cu apă uzată menajeră. Se prelevează o probă proaspătă de apă uzată; se transportă în condiții aerobe. Se lasă să se decanteze timp de o oră sau se filtrează prin hârtie de filtru cu porozitate mare. Se menține efluentul decantat sau filtrat în condiții aerobe până în momentul folosirii. Până la 100 ml din acest tip de inocul se poate folosi pe litru de mediu mineral.

**▼B**

O altă sursă de inocul este apa de suprafață. În acest caz, se prelevează o probă de apă de suprafață adecvată (de exemplu, râu, lac) și se menține în condiții aerobe până în momentul folosirii. Dacă este nevoie, inoculul se concentrează prin filtrare sau centrifugare.

**I.6.5. Precon condiționarea inoculului**

Inoculul poate fi precon condiționare și adus în condițiile de testare, dar nu și preadaptat la substanța de testat. Precon condiționarea constă în aerarea nămolului activ în mediu mineral sau efluent secundar timp de 5-7 zile, la temperatura de testare. Această precon condiționare îmbunătățește uneori precizia metodelor prin reducerea valorilor din probele martor. Nu se consideră necesară precon condiționarea inoculului în cazul testului MITI.

**I.6.6. Martori abiotici**

Dacă este necesar, posibila degradare abiotică a substanței de testat se verifică prin determinarea îndepărtării COD, a consumului de oxigen sau a eliminării bioxidului de carbon în probe martor sterile, care nu conțin inocul. Se sterilizează prin filtrare cu membrană filtrantă (0,2 - 0,45 μm) sau prin adăugarea unei substanțe toxice adecvate într-o concentrație corespunzătoare. Dacă se folosește filtrarea prin membrană, se prelevează probe în mod aseptice, pentru a menține sterilitatea. Dacă nu s-a realizat înainte adsorbția substanței de testat, testele care măsoară biodegradarea ca îndepărtare a COD, în special cele care folosesc ca inocul nămolul activ, trebuie să includă un martor abiotic care este inoculat și otrăvit.

**I.6.7. Număr de vase**

Numărul de vase într-un experiment tipic este prezentat în capitolul aferent fiecărui test.

Se pot folosi următoarele tipuri de vase:

- Suspensie de testare: conține substanță de testat și inocul
- Proba martor cu inocul: conține numai inocul
- Martor de metodă: conține substanță de referință și inocul
- Martor steril abiotic: conține substanță de testat, steril (a se vedea punctul I.6.6)
- Martor de adsorbție: conține substanță de testat, inocul și agentul de sterilizare
- Martor de toxicitate: conține substanță de testat, substanță de referință și inocul

Este obligatoriu ca testul propriu-zis și testul martor cu inocul să se facă în paralel. Este de dorit să se facă determinări și în alte vase, în paralel.

Acest lucru s-ar putea totuși să nu fie posibil întotdeauna. Se asigură suficiente probe sau citiri pentru a permite evaluarea procentului de degradare a substanței într-o perioadă de 10 zile.

**▼B****I.7. DATE ȘI EVALUARE**

Pentru calcularea lui  $D_t$ , degradarea procentuală, se folosesc valorile medii ale măsurătorilor duplicate ale parametrilor determinați atât în testul propriu-zis, cât și în proba martor cu inocul. Formulele matematice pentru calcularea  $D_t$  sunt prezentate în capitolele de mai jos pentru fiecare test. Evoluția degradării este ilustrată grafic și se indică fereastra de 10 zile. Se calculează și se consemnează procentul de eliminare a substanței obținut la sfârșitul perioadei de 10 zile și valoarea corespunzătoare aplatizării curbei de biodegradare sau sfârșitului testului, după caz.

La testele respirometrice, compușii care conțin azot pot afecta consumul de oxigen din cauza nitrificării (a se vedea apendicele 2 și 5).

**I.7.1. Măsurarea degradării prin intermediul determinării COD**

Pentru a se putea evalua validitatea testului (a se vedea punctul I.5.2), se calculează  $D_t$ , degradarea procentuală, de fiecare dată când se prelevează o probă, și anume se calculează separat pentru vasele conținând substanța de testat folosind media valorilor din măsurătorile COD duplicate. Se calculează folosind următoarea ecuație:

$$D_t = \left( 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

unde:

$D_t$  = % degradare la timpul  $t$

$C_o$  = concentrația medie inițială a COD în mediul de cultură inoculat ce conține substanța de testat (mg COD/l)

$C_t$  = concentrația medie a COD la timpul  $t$  în mediul de cultură inoculat ce conține substanța de testat (mg COD/l)

$C_{b0}$  = concentrația medie inițială a COD în proba martor cu mediu mineral inoculat (mg COD/l)

$C_{bt}$  = concentrația medie a COD la timpul  $t$  în proba martor cu mediu mineral inoculat (mg COD/l)

Toate concentrațiile se măsoară experimental.

**I.7.2. Măsurarea degradării prin intermediul analizei specifice**

Dacă sunt disponibile date analitice specifice, biodegradarea primară se calculează din:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

unde:

$D_t$  = % degradare la un timp  $t$ , în mod normal 28 zile

$S_a$  = cantitatea reziduală de substanță de testat în mediu inoculat, la sfârșitul testării (mg)

$S_b$  = cantitatea reziduală de substanță de testat în proba martor, cu apă/mediu mineral, la care s-a adăugat numai substanța de testat (mg)

**▼B****I.7.3. Degradarea abiotică**

Dacă se folosește un martor steril, abiotic, degradarea abiotică se calculează în procente folosind formula:

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

unde:

$C_{s(o)}$  = concentrația COD în martorul steril la ziua 0

$C_{s(t)}$  = concentrația COD în martorul steril în ziua t

**I.8. RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele date:

- substanțele chimice de testat și de referință, precum și puritatea lor;
- condițiile de testare;
- inocul: natura, locul de prelevare, concentrația și eventuala preconditionare;
- proporția și natura deșeurilor industriale prezente în nămol, dacă se cunosc;
- durata și temperatura testului;
- în cazul substanțelor greu solubile, tratamentul aplicat;
- metoda de testare aplicată; pentru orice modificare a modului de operare trebuie prezentate argumentele științifice și explicația;
- fișa de date;
- orice fenomene de inhibiție observate;
- orice degradare abiotică observată;
- date analitice specifice, dacă sunt disponibile;
- date analitice referitoare la produsele intermediare, dacă există;
- graficul degradării, exprimat în procente în funcție de timp pentru substanțele de testat și de referință; faza de latență, faza de degradare, fereastra de 10 zile și panta sunt indicate clar (apendicele 1). Dacă testul satisface criteriile de validare, la trasarea graficului se poate folosi media procentelor de eliminare ale vaselor ce conțin substanța de testat;
- eliminarea procentuală după fereastra de 10 zile și cea corespunzătoare aplatizării curbei de biodegradare sau sfârșitului testului.

**PARTEA II. TESTUL DE EPUIZARE COD (Metoda C.4-A)****II.1. PRINCIPIUL METODEI**

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat care conține o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-40 mg COD/l) ca singura sursă nominală de carbon organic, se aerează la întuneric sau lumină difuză la  $22 \pm 2$  °C.

**▼B**

Degradarea este urmată de analiza COD la intervale frecvente pe o perioadă de 28 de zile. Gradul de biodegradare se calculează exprimând concentrația COD îndepărtată (corectată în funcție de cea din proba martor cu inocul) ca procent din concentrația prezentă inițial. Gradul de biodegradare primară poate fi, de asemenea, calculat din analiza chimică suplimentară făcută la începutul și la sfârșitul incubării.

**II.2. DESCRIEREA METODEI****II.2.1. Aparatură**

- (a) vase conice, de exemplu, 250 ml-2 litri în funcție de volumul necesar pentru analiza COD;
- (b) agitatoare pentru vase conice, fie cu control automat al temperaturii, fie fără acest control, dar folosite într-o încăpere cu temperatură constantă și având putere suficientă pentru a menține condițiile aerobe în toate vasele;
- (c) aparatură de filtrare cu membrane adecvate;
- (d) analizor COD;
- (e) oxigenometru;
- (f) centrifugă.

**II.2.2. Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

**II.2.3. Prepararea și adaptarea inoculului**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: efluenți uzați, ape de suprafață, soluri sau dintr-un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

**II.2.4. Pregătirea vaselor**

De exemplu, se introduc 800 ml de mediu mineral în vase conice de 2 litri și se adaugă volume suficiente de soluții mamă ale substanțelor de testat și de referință în fiecare vas pentru a obține o concentrație a substanței chimice echivalentă cu 10-40 mg COD/l. Se verifică valorile pH și se reglează, după caz, la 7,4. Se inoculează vasele cu nămol activ sau cu o altă sursă de inocul (a se vedea punctul I.6.4), pentru a obține o concentrație finală nu mai mare de 30 mg solide în suspensie/l. De asemenea, se prepară probe martor de inocul în mediu mineral, dar fără substanță de testat sau de referință.

După caz, se folosește un vas pentru a verifica efectul inhibitor posibil al substanței de testat, inoculând o soluție în mediu mineral având concentrații comparabile ale substanței de testat și ale celei de referință.

De asemenea, dacă este necesar, se pregătește încă un vas, steril, pentru a verifica dacă substanța de testat este degradată abiotoc, folosind o soluție neinoculată a substanței de testat (a se vedea punctul I.6.6).

**▼B**

Suplimentar, dacă se presupune că substanța de testat este adsorbită în mod semnificativ pe sticlă, nămol etc., se face o estimare preliminară pentru a determina gradul probabil de adsorbție și, astfel, adecvarea testului la substanța respectivă (a se vedea tabelul 1). Se folosește un vas ce conține substanță de testat, inocul și agent de sterilizare.

Se completează volumele în toate vasele până la 1 litru cu mediu mineral și, după amestecare, se ia o probă din fiecare vas pentru a determina concentrația inițială a COD (a se vedea apendicele 2 punctul 4). Se acoperă gura vaselor, de exemplu, cu folie de aluminiu, astfel încât să se permită schimbul liber de aer între vas și atmosfera înconjurătoare. Apoi acestea se montează la agitatoare pentru începerea testului.

**II.2.5. Numărul de vase într-o testare tipică**

Vasele 1 și 2: suspensia de testare

Vasele 3 și 4: proba martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de adsorbție

Vasul 8: martor de toxicitate

A se vedea și punctul I.6.7.

**II.2.6. Efectuarea testului**

Pe parcursul testului se determină concentrațiile COD în fiecare vas, în duplicat și la intervalele de timp cunoscute, suficient de frecvent pentru a putea determina începutul ferestrei de 10 zile și eliminarea procentuală la sfârșitul ferestrei de 10 zile. Se prelevează numai volumul minim de suspensie necesar pentru fiecare determinare.

Înainte de prelevarea probelor se completează pierderile cauzate de evaporare, adăugând apă de diluție (punctul I.6.1) în cantitatea necesară, după caz. Se amestecă mediul de cultură foarte bine, verificând dacă materialul ce aderă pe pereții vaselor s-a dizolvat sau a trecut în suspensie. Se filtrează prin membrană sau se centrifughează proba (a se vedea apendicele 2 punctul 4), imediat după ce a fost prelevată. Probele filtrate sau centrifugate se analizează în aceeași zi sau se depozitează la 2-4 °C timp de maxim 48 de ore ori se mențin la temperaturi mai mici de - 18 °C pentru un timp mai îndelungat.

**II.3. DATE ȘI RAPORT****II.3.1. Interpretarea rezultatelor**

Se calculează degradarea în procente la timpul  $t$  conform punctului I.7.1 (determinare COD) și, opțional, punctului I.7.2. (analize specifice).

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date prevăzute.

**▼B****II.3.2. Validarea rezultatelor**

A se vedea punctul I.5.2.

**II.3.3. Raportul de testare**

A se vedea punctul I.8.

**II.4. FIȘA DE DATE**

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

**TEST DE EPUIZARE COD****1. LABORATOR****2. DATA ÎNCEPERII TESTULUI****3. SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță

Concentrația inițială în mediul de testare,  $t_0$ : mg/l substanță

**4. INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația solidelor în suspensie în amestecul de reacție: mg/l

**5. DETERMINĂRI DE CARBON**

Analizor de carbon:

|                              | Vas nr. |                        | COD după n zile (mg/l) |       |       |       |       |
|------------------------------|---------|------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                              |         |                        | 0                      | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| Substanță de testat + inocul | 1       | $a_1$                  |                        |       |       |       |       |
|                              |         | $a_2$                  |                        |       |       |       |       |
|                              |         | a, medie<br>$C_{a(t)}$ |                        |       |       |       |       |
|                              | 2       | $b_1$                  |                        |       |       |       |       |
|                              |         | $b_2$                  |                        |       |       |       |       |
|                              |         | b, medie<br>$C_{b(t)}$ |                        |       |       |       |       |



**▼ B**

|   | Vas nr.                                     |                            | COD după n zile (mg/l) |                |                |                |                |
|---|---|----------------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   |   |                            | 0                      | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>4</sub> |
| Probă martor cu inocul fără substanță de testat | 3   | c <sub>1</sub>             |                        |                |                |                |                |
|   |   | c <sub>2</sub>             |                        |                |                |                |                |
|   |   | c, medie C <sub>c(t)</sub> |                        |                |                |                |                |
|   | 4   | d <sub>1</sub>             |                        |                |                |                |                |
|   |   | d <sub>2</sub>             |                        |                |                |                |                |
|   |   | d, medie C <sub>d(t)</sub> |                        |                |                |                |                |
|   | $C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ |                            |                        |                |                |                |                |

**6. EVALUAREA DATELOR BRUTE**

| Vas nr.   |  | % degradare după n zile |                |                |                |                |
|-----------|--|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|           |  | 0                       | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>4</sub> |
| 1         | $D_1 = \left(1 - \frac{C - C_{b1(t)}}{C_{a(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$ | 0                       |                |                |                |                |
| 2         | $D_2 = \left(1 - \frac{C - C_{b1(t)}}{C_{b(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$ | 0                       |                |                |                |                |
| Medie (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$  | 0                       |                |                |                |                |

(\*) D<sub>1</sub> și D<sub>2</sub> nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

*Notă:* formate similare se pot folosi pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate.

**7. MARTOR ABIOTIC (Opțional)**

|                                 | Timp (zile)       |                   |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                 | 0                 | t                 |
| Conc. COD mg/l în martor steril | C <sub>s(0)</sub> | C <sub>s(t)</sub> |

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

**8. ANALIZE CHIMICE SPECIFICE (Opțional)**

|               | Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l) | % degradare primară |
|---------------|--|---------------------|
| Martor steril | S <sub>b</sub>   |                     |

**▼B**

|                           | Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l) | % degradare primară                |
|---------------------------|--|------------------------------------|
| Mediu de testare inoculat | $S_a$  | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

**PARTEA III. TESTUL DE SCREENING MODIFICAT OCDE**  
(Metoda C.4-B)

**III.1. PRINCIPIUL METODEI**

Un volum măsurat de mediu mineral, cu o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-40 mg COD/l) ca singura sursă nominală de carbon organic, se inoculează cu 0,5 ml efluent/litru de mediu. Amestecul se aerează la întuneric sau lumină difuză la 22 °C ± 2 °C.

Degradarea este urmată de analiza COD la intervale frecvente într-o perioadă de 28 de zile. Gradul de biodegradare este calculat exprimând concentrația COD eliminată (corectată în funcție de cea din proba martor cu inocul) ca procent din concentrația inițială. Gradul de biodegradare primară poate fi de asemenea calculat din analiza chimică suplimentară făcută la începutul și sfârșitul incubării.

**III.2. DESCRIEREA METODEI**

**III.2.1. Aparatură**

- (a) vase conice, de exemplu, de la 250 ml la 2 litri, în funcție de volumul necesar pentru analiza COD;
- (b) agitatoare pentru vase conice, fie cu control automat al temperaturii, fie fără acest control, dar folosite într-o încăpere cu temperatură constantă și având putere suficientă pentru a menține condițiile aerobe în toate vasele;
- (c) aparatură de filtrare cu membrane adecvate;
- (d) analizor COD;
- (e) oxigenometru;
- (f) centrifugă.

**III.2.2. Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

Această metodă folosește numai 0,5 ml efluent/litru ca inocul și prin urmare mediul poate necesita adăugarea de microelemente și factori de creștere. Acest lucru se face prin adăugarea câte unui mililitru din fiecare din următoarele soluții/litru de mediu final:

**▼B**

Soluție cu microelemente:

|   |          |
|---|----------|
| Sulfat de mangan tetrahidrat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 39,9 mg  |
| Acid boric, $\text{H}_3\text{BO}_3$                                     | 57,2 mg  |
| Sulfat de zinc heptahidrat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   | 42,8 mg  |
| Heptamolibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$     | 34,7 mg  |
| Chelați de fier ( $\text{FeCl}_3$ cu acid etilendiamin-tetraacetic)     | 100,0 mg |
| Se dizolvă și se aduce până la 1 000 ml cu apă de diluție               |          |

Soluție de vitamine:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Extract de drojdie | 15,0 mg |
|--------------------|---------|

Se dizolvă extractul de drojdie în 100 ml apă. Se sterilizează prin trecere printr-o membrană de 0,2 microni sau se pregătește proaspătă.

### III.2.3. Prepararea și condiționarea inoculului

Inoculul este obținut din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care folosește în special ape menajere (a se vedea punctele I.6.4.2 și I.6.5).

Se folosesc 0,5 ml/l de mediu mineral.

### III.2.4. Pregătirea vaselor

De exemplu, se introduc câte 800 ml de mediu mineral în vase conice de 2 litri și se adaugă volume suficiente de soluții mamă ale substanțelor de testat și de referință, în vase separate, pentru a obține o concentrație a substanței echivalentă cu 10-40 mg COD/l. Se verifică valoarea pH-ului și se reglează, dacă este necesar, la 7,4. Se inoculează vasele cu 0,5 ml/l efluent de apă reziduală (a se vedea punctul I.6.4.2). De asemenea, se prepară probe de inocul pentru martor, în mediu mineral, fără substanță de testat sau de referință.

Dacă este necesar, se folosește un vas pentru a verifica posibilul efect inhibitor al substanței, inoculând o soluție în mediu mineral având concentrații comparabile ale substanței de testat și de referință.

De asemenea, dacă este necesar, se pregătește încă un vas, steril, pentru a se verifica dacă substanța de testat este degradată abiotic, folosind o soluție neinoculată a substanței de testat (a se vedea punctul I.6.6).

Suplimentar, dacă se presupune că substanța de testat este adsorbită în mod semnificativ pe sticlă, nămol etc., se face o estimare preliminară pentru a determina gradul probabil de adsorbție și, astfel, adecvarea testului la substanța respectivă (a se vedea tabelul 1). Se folosește un vas ce conține substanță de testat, inocul și agent de sterilizare.

Se completează volumele în toate vasele până la 1 litru cu mediu mineral și, după amestecare, se ia o probă din fiecare vas pentru a determina concentrația inițială a COD (a se vedea appendicele 2 punctul 4). Se acoperă gura vaselor, de exemplu, cu folie de aluminiu, astfel încât să se permită schimbul liber de aer între vas și atmosfera înconjurătoare. Apoi acestea se montează la agitatoare pentru începerea testului.

**▼B****III.2.5. Numărul de vase într-un test tipic**

Vasele 1 și 2: suspensia de testare

Vasele 3 și 4: probă martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de adsorbție

Vasul 8: martor de toxicitate

A se vedea și punctul I.6.7.

**III.2.6. Desfășurarea testului**

Pe parcursul testului se determină concentrațiile COD în fiecare vas, în duplicat și la intervalele de timp cunoscute, suficient de frecvent pentru a putea determina începutul ferestrei de 10 zile și eliminarea procentuală la sfârșitul ferestrei de 10 zile. Se prelevează numai volumul minim de suspensie necesar pentru fiecare determinare.

Înainte de prelevarea probelor se completează pierderile cauzate de evaporare, adăugând apă de diluție (punctul I.6.1) în cantitatea necesară, după caz. Se amestecă mediul de cultură foarte bine, verificând dacă materialul ce aderă pe pereții vaselor s-a dizolvat sau a trecut în suspensie. Se filtrează prin membrană sau se centrifughează proba (a se vedea apendicele 2 punctul 4), imediat după ce a fost prelevată. Probele filtrate sau centrifugate se analizează în aceeași zi sau se depozitează la 2-4 °C timp de maxim 48 de ore ori se mențin la temperaturi mai mici de – 18 °C pentru un timp mai îndelungat.

**III.3. DATE ȘI RAPORT****III.3.1. Interpretarea rezultatelor**

Se calculează degradarea în procente la timpul *t* conform punctului I.7.1 (determinare COD) și, opțional, punctului I.7.2 (analize specifice).

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date prevăzute.

**III.3.2. Validarea rezultatelor**

A se vedea punctul I.5.2.

**III.3.3. Raportul de testare**

A se vedea punctul I.8.

**III.4. FIȘA DE DATE**

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

**TEST DE SCREENING MODIFICAT OCDE****1. LABORATOR****2. DATA ÎNCEPERII TESTULUI**

**▼B****3. SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță

Concentrația inițială în mediul de testare,  $t_0$ : mg/l substanță**4. INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația materiilor în suspensie în amestecul de reacție:  
mg/l**5. DETERMINĂRI DE CARBON**

Analizor de carbon:

|   | Vas nr.                                     |                        | COD după n zile (mg/l) |       |       |       |       |
|---|---|------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|
|   |   |                        | 0                      | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| Substanță de testat<br>+ inocul                       | 1   | $a_1$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | $a_2$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | a, medie<br>$C_{a(t)}$ |                        |       |       |       |       |
|   | 2   | $b_1$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | $b_2$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | b, medie<br>$C_{b(t)}$ |                        |       |       |       |       |
| Probă martor cu<br>inocul fără<br>substanță de testat | 3   | $c_1$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | $c_2$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | c, medie $C_{c(t)}$    |                        |       |       |       |       |
|   | 4   | $d_1$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | $d_2$                  |                        |       |       |       |       |
|   |   | d, medie<br>$C_{d(t)}$ |                        |       |       |       |       |
|   | $C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ |                        |                        |       |       |       |       |

**6. EVALUAREA DATELOR BRUTE**

| Vas nr. |   | % degradare după n zile |       |       |       |       |
|---------|---|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
|         |   | 0                       | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| 1       | $D_1 = \left( 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{b1(t)}}{C_{a(0)} - C_{b1(0)}} \right) \times 100$ | 0                       |       |       |       |       |

**▼B**

| Vas nr.   |   | % degradare după n zile |                |                |                |                |
|-----------|---|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|           |   | 0                       | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>4</sub> |
| 2         | $D_2 = \left( 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bI(t)}}{C_{b(0)} - C_{bI(0)}} \right) \times 100$ | 0                       |                |                |                |                |
| Medie (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$   | 0                       |                |                |                |                |

(\*) D<sub>1</sub> și D<sub>2</sub> nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

*Notă:* formate similare se pot folosi pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate.

#### 7. MARTOR ABIOTIC (Opțional)

|                                   | Timp (zile)       |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                   | 0                 | t                 |
| Conc. COD (mg/l) în martor steril | C <sub>s(0)</sub> | C <sub>s(t)</sub> |

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

#### 8. ANALIZE CHIMICE SPECIFICE (Opțional)

|                           | Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l) | % degradare primară                |
|---------------------------|--|------------------------------------|
| Martor steril             | S <sub>b</sub>   |                                    |
| Mediu de testare inoculat | S <sub>a</sub>   | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

### PARTEA IV. TESTUL DE DEGAJARE A CO<sub>2</sub> (Metoda C.4-C)

#### IV.1. PRINCIPIUL METODEI

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat, cu o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-20 mg COD sau TOC/l) ca unică sursă nominală de carbon organic, se aerează prin trecerea aerului fără dioxid de carbon, cu debit controlat, la întuneric sau la lumină difuză. Degradarea este urmărită timp de 28 zile prin determinarea dioxidului de carbon produs, care este absorbit pe hidroxid de bariu sau de sodiu și este măsurat prin titrarea hidroxidului rămas sau drept carbon anorganic. Cantitatea de dioxid de carbon produs de substanța de testat (corectată cu cea rezultată din proba martor cu inocul) este exprimată ca procent din CO<sub>2</sub>T. Gradul de biodegradare se poate de asemenea calcula din analizele COD suplimentare, făcute la începutul și la sfârșitul incubării.

**▼B****IV.2. DESCRIEREA METODEI****IV.2.1. Aparatură**

- (a) vase de 2-5 litri, fiecare prevăzut cu un tub de aerare cu un capăt ajungând aproape de baza vasului și cu celălalt ieșind din vas;
- (b) agitatoare magnetice, când se testează substanțe puțin solubile;
- (c) vase pentru absorbția gazului;
- (d) dispozitiv pentru controlul și măsurarea debitului de aer;
- (e) aparatură pentru absorbția dioxidului de carbon, pentru prepararea aerului care nu conține dioxid de carbon; ca alternativă, se poate folosi un amestec de oxigen fără CO<sub>2</sub> și azot fără CO<sub>2</sub>, din butelie, în proporția corectă (20 % O<sub>2</sub>: 80 % N<sub>2</sub>);
- (f) dispozitiv pentru determinarea dioxidului de carbon, fie prin titrimetrie, fie printr-una din analizele cantitative ale carbonului anorganic;
- (g) dispozitiv de filtrare cu membrană (opțional);
- (h) analizor de COD (opțional).

**IV.2.2. Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la un 1 litru cu apă de diluție.

**IV.2.3. Prepararea și preconditionarea inoculului**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: nămol activ, efluenți menajeri, ape de suprafață, soluri sau un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

**IV.2.4. Pregătirea vaselor**

Ca exemplu, următoarele volume și cantități sunt indicate pentru vase de 5 litri ce conțin 3 l de suspensie. Dacă se folosesc volume mai mici, valorile se modifică în consecință, dar se asigură precizia măsurării dioxidului de carbon format.

În fiecare vas de 5 litri se introduc 2 400 ml mediu mineral. Se adaugă un volum adecvat de nămol activ preparat (a se vedea punctele I.6.4.1 și I.6.5) pentru a rezulta o concentrație de solide în suspensie de cel mult 30 mg/l în 3 l de amestec inoculat. Ca alternativă, mai întâi se diluează nămolul preparat pentru a rezulta o suspensie de 500-1 000 mg/l în mediu mineral, înainte de adăugarea unei cantități alicote la conținutul vasului de 5 litri astfel încât să se obțină o concentrație de 30 mg/l; astfel se asigură o precizie mai mare. Pot fi folosite alte surse de inocul (a se vedea punctul I.6.4.2).

Acest amestec inoculat se aerează peste noapte, cu aer fără CO<sub>2</sub>, pentru a elimina dioxidul de carbon din sistem.

**▼B**

Se adaugă volume cunoscute din soluțiile mamă ale materialului de testat și ale substanței de referință, separat, în vase de testare replicate, astfel încât concentrațiile de COD sau de COT provenite din substanțele adăugate să fie cuprinse între 10 și 20 mg/l; se lasă câteva vase fără adăugare de substanță de testat, fiind folosite drept martori pentru inocul. Substanțele de testat puțin solubile se adaugă direct în vas în funcție de greutate sau volum sau sunt tratate conform descrierii din apendicele 3.

Dacă este necesar, un vas se folosește pentru a verifica posibilul efect inhibitor al substanței de testat, prin adăugarea atât a substanței respective, cât și a substanței de referință, în aceleași concentrații ca și cele prezente în alte vase.

De asemenea, dacă este necesar, se folosește un vas steril pentru a verifica dacă substanța de testat este degradată abiotice, prin folosirea unei soluții neinoculate de substanță (a se vedea punctul I.6.6). Se sterilizează prin adăugarea unei substanțe toxice în concentrație adecvată.

Se aduc volumele de suspensii din toate vasele la 3 litri, prin adăugarea de mediu mineral înainte de aerare cu aer fără CO<sub>2</sub>. Opțional, pot fi luate probe pentru analiza COD (a se vedea apendicele 2 punctul 4) și/sau pentru analize specifice. Se conectează vasele de absorbție la aerisirile vaselor.

Dacă se folosește hidroxid de bariu, se conectează trei vase de absorbție, fiecare conținând 100 ml de soluție de hidroxid de bariu 0,0125 M, în serie cu fiecare dintre vasele de 5 litri. Soluția trebuie să nu conțină sulfat și carbonat precipitat, iar concentrația sa se determină imediat înainte de utilizare. Dacă se folosește hidroxid de sodiu, se conectează două vase în paralel, cel de-al doilea acționând ca martor pentru a demonstra că tot dioxidul de carbon a fost absorbit în primul. Sunt adecvate vase de absorbție cu sistemul de închidere al flacoanelor pentru ser. Se adaugă 200 ml de hidroxid de sodiu 0,05 M la fiecare vas, ceea ce este suficient pentru a absorbi cantitatea totală de dioxid de carbon degajată, când substanța de testat este complet degradată. Soluția de hidroxid de sodiu, chiar când este proaspăt preparată, conține urme de carbonați; aceasta este corectată prin deducerea carbonatului din proba martor.

#### IV.2.5. Numărul de vase pentru o testare tipică

Vasele 1 și 2: suspensie de testare

Vasele 3 și 4: probă martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de toxicitate

A se vedea, de asemenea, punctul I.6.7.

#### IV.2.6. Desfășurarea testului

Testul începe cu barbotarea aerului fără CO<sub>2</sub> prin suspensie la o viteză de 30-100 ml/min. Se prelevează periodic probe din absorbantul dioxidului de carbon, pentru analizarea conținutului de CO<sub>2</sub>. În timpul primelor zece zile este recomandat ca analizele să fie făcute în fiecare a doua sau a treia zi și apoi în fiecare a 5-a zi până la a 28-a zi, astfel încât perioada ferestrei de 10 zile să poată fi identificată.



**▼B**

În a 28-zi se prelevează probe (opțional) pentru determinarea COD și/sau analize specifice, se măsoară pH-ul suspensiei și se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat la fiecare vas; se aerează vasele peste noapte pentru a elimina dioxidul de carbon prezent în suspensii. În ziua a 29-a se face ultima analiză a dioxidului de carbon degajat.

În zilele în care se determină  $\text{CO}_2$ , se deconectează vasul de absorbție cu hidroxid de bariu cel mai apropiat de vas și se titrează soluția de hidroxid cu  $\text{HCl}$  0,05 M, folosind fenolftaleină ca indicator. Se mută vasele de absorbție rămase cu un loc mai aproape de vas și se adaugă un nou vas ce conține 100 ml hidroxid de bariu proaspăt 0,0125 M, ultimul în serie. Se fac titrări când e necesar, de exemplu când se observă un precipitat substanțial în primul vas de absorbție și înainte ca în cel de-al doilea să se observe ceva, sau cel puțin săptămânal. Ca alternativă, când se folosește  $\text{NaOH}$  ca absorbant, se ia cu o seringă o probă (depinzând de caracteristicile analizorului de carbon folosit) de soluție de hidroxid de sodiu din vasul de absorbție mai apropiat de vasul de testare. Se injectează proba în partea anorganică ( $\text{CA}$ ) a analizorului de carbon pentru analiza directă a dioxidului de carbon degajat.

Se analizează conținutul celui de-al doilea vas de absorbție numai la sfârșitul testului, pentru a face corecția datelor în cazul în care dioxidul de carbon a pătruns și în acest vas.

#### IV.3. DATE ȘI RAPORT

##### IV.3.1. Interpretarea rezultatelor

Cantitatea de  $\text{CO}_2$  captată de absorbant și titrată este dată de formula:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

unde:

$V$  = volumul de  $\text{HCl}$  folosit pentru titrarea a 100 ml de absorbant (ml)

$C_B$  = concentrația soluției de hidroxid de bariu (M)

$C_A$  = concentrația soluției de acid clorhidric (M)

dacă  $C_B$  este 0,0125 M, iar  $C_A$  este 0,05 M, 100 ml hidroxid de bariu se titrează cu 50 ml, iar cantitatea de  $\text{CO}_2$  este dată de formula:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrat} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Astfel, în acest caz, pentru a converti volumul de  $\text{HCl}$  titrat în mg  $\text{CO}_2$  produs, factorul este 1,1.

Se calculează cantitățile de  $\text{CO}_2$  produs de inocul în sine și de inocul plus substanța de testat, folosind respectivele valori de titrare, diferența fiind cantitatea de  $\text{CO}_2$  produsă numai de substanța de testat.

De exemplu, dacă martorul cu inocul se titrează cu 48 ml și proba conținând inocul plus substanța de testat cu 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ de la inocul} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

**▼B**

$\text{CO}_2$  de la inocul plus substanța de testat =  $1,1 \times (50 - 45) = 5,5$  mg

Astfel, cantitatea de  $\text{CO}_2$  produsă de substanța de testat este de 3,3 mg.

Procentul de biodegradabilitate se calculează din formula:

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ produs} \times 100}{\text{CO}_2\text{T} \times \text{mg substanța de testare adăugată}}$$

sau

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ produs} \times 100}{\text{mg COT adăugat în test} \times 3,67}$$

3,67 fiind factorul de conversie (44/12) de la carbon la dioxid de carbon.

Se calculează degradarea procentuală în orice moment ca sumă a procentelor teoretice de eliminare a  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2\text{T}$ ) calculate pentru fiecare din zilele în care eliminarea  $\text{CO}_2$  a fost măsurată.

Pentru vasele de absorbție cu hidroxid de sodiu se calculează cantitatea de dioxid de carbon produs, exprimat ca CI (mg), prin înmulțirea concentrației de CI în absorbant cu volumul de absorbant.

Se calculează procentul de degradare din:

$$\% \text{ COT} = \frac{\text{mg CI din vasul de test} - \text{mg CI din blanc}}{\text{mg COT mg adăugat ca substanță de test}} \times 100$$

Se calculează COD eliminat (opțional) conform descrierii de la punctul I.7. Se înregistrează aceste rezultate și toate celelalte rezultate pe fișele de date prevăzute.

#### IV.3.2. Validarea rezultatelor

Conținutul de CI al suspensiei de substanță în mediul mineral la începutul testului trebuie să fie mai mic decât 5 % din CT, iar  $\text{CO}_2$  total din marorul cu inocul, la sfârșitul testului, nu va depăși în mod normal media de 40 mg/l. Dacă se obțin valori mai mari de 70 mg  $\text{CO}_2$ /litru, datele și tehnica experimentală vor fi supuse unui examen critic.

A se vedea, de asemenea, I.5.2.

#### IV.3.3. Raportul de testare

A se vedea I.8.

#### IV.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat în continuare.

#### TEST DE DEGAJARE A DIOXIDULUI DE CARBON

##### 1. LABORATOR

##### 2. DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI

##### 3. SUBSTANȚA DE TESTAT

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/litru substanță

**▼B**

Concentrația inițială în mediu: mg/litru substanță

C total adăugat în vas: mg C

CO<sub>2</sub>T: mg CO<sub>2</sub>

#### 4. INOCUL

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația de solide în suspensie în amestecul de reacție:  
mg/litru

#### 5. PRODUCEREA DIOXIDULUI DE CARBON ȘI DEGRADABILITATEA

Metodă: Ba(OH)<sub>2</sub>/NaOH/altele

| Timpul         | CO <sub>2</sub> format<br>Test (mg) |       | CO <sub>2</sub> format<br>Probă martor (mg) |       | CO <sub>2</sub> cumulat (mg)<br>(media test minus<br>proba martor) |   | CO <sub>2</sub> T<br>$\frac{\text{CO}_2\text{cumulat}}{\text{CO}_2\text{T}} \times 100$ |   |       |
|----------------|-------------------------------------|-------|---|-------|--|---|---|---|-------|
|                | 1<br>2                              | media | 3<br>4                                      | media | 1  | 2 | 1   | 2 | media |
| 0              |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
| n <sub>1</sub> |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
| n <sub>2</sub> |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
| n <sub>3</sub> |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
|                |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
|                |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |
| 28             |                                     |       |   |       |  |   |   |   |       |

Notă: Pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate pot fi folosite formate similare.

#### 6. ANALIZA CARBONULUI (opțional)

Analizor de carbon:

| Timpul (ziua) | Proba martor mg/l | Substanța de testat mg/l |
|---------------|-------------------|--------------------------|
| 0             | C <sub>b(0)</sub> | C <sub>o</sub>           |
| 28 (*)        | C <sub>b(t)</sub> | C <sub>t</sub>           |

(\*) sau la sfârșitul incubării.

**▼B**

$$\% \text{ COD eliminat} = \left( 1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

**7. DEGRADAREA ABIOTICĂ (opțional)**

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{\text{formare CO}_2 \text{ în vas steril după 28 de zile (mg)}}{\text{CO}_2\text{T (mg)}} \times 100$$

**PARTEA V. TESTUL DE RESPIROMETRIE MANOMETRICĂ (Metoda C.4-D)****V.1. PRINCIPIUL METODEI**

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat, cu o concentrație cunoscută din substanța de testat (100 mg/litru de substanță testată, pentru a rezulta cel puțin 50-100 mg CTO/litru), ca unică sursă nominală de carbon organic, este agitat într-un vas închis, la o temperatură constantă ( $\pm 1$  °C sau mai apropiat) timp de mai mult de 28 zile. Consumul de oxigen se determină fie prin măsurarea cantității de oxigen (produs electrolitic) necesare pentru menținerea constantă a volumului de gaz din vasul respirometrului, fie din schimbări ale volumului sau presiunii (sau o combinație a celor două) în aparatură. Dioxidul de carbon degajat este absorbit într-o soluție de hidroxid de potasiu sau într-un alt absorbant potrivit. Cantitatea de oxigen consumată de substanța de testat (corectată cu cea consumată de proba martor cu inocul testat în paralel) este exprimată ca procent de CTO sau CCO. Opțional, biodegradabilitatea primară poate fi de asemenea calculată prin analize specifice suplimentare, făcute la începutul și la sfârșitul incubării, iar biodegradabilitatea finală prin analiza COD.

**V.2. DESCRIEREA METODEI****V.2.1. Aparatură**

- (a) respirometru adecvat;
- (b) dispozitiv martor a temperaturii, menținută la  $\pm 1$  °C sau mai precis;
- (c) dispozitiv de filtrare prin membrană (opțional);
- (d) analizor de carbon (opțional).

**V.2.2. Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

**V.2.3. Prepararea și condiționarea inoculului**

Inoculul poate proveni de la o varietate de surse: nămol activ, efluenți menajeri, ape de suprafață, soluri sau dintr-un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

**V.2.4. Pregătirea vaselor**

Folosind soluții mamă, se prepară în șarje separate soluții ale substanțelor de testat și de referință în mediu mineral, astfel încât să rezulte, de regulă, o concentrație de 100 mg substanță/litru (rezultând cel puțin 50-100 mg CTO/litru).

**▼B**

Se calculează CTO pe baza formării sărurilor de amoniu, dacă nu se anticipează nitrificarea, caz în care calculul va fi bazat pe formarea nitraților (a se vedea apendicele 2 punctul 2).

Se determină valorile pH-ului și, dacă este necesar, se reglează la  $7,4 \pm 0,2$ .

Substanțele greu solubile vor fi adăugate în ultima etapă (a se vedea mai jos).

Dacă se determină toxicitatea substanței de testat, se prepară o altă soluție în mediu mineral ce conține atât substanță de testat, cât și substanță de referință, în concentrații similare cu cele ale soluțiilor individuale.

Dacă sunt necesare măsurători ale consumului fizico-chimic de oxigen se prepară o soluție a substanței de testat având de regulă 100 mg CTO/litru, care se sterilizează prin adăugarea unei substanțe toxice potrivite (a se vedea punctul I.6.6).

Se introduc volumele necesare de soluții ale substanței de testat și de referință, în cel puțin două vase. În alte vase se adaugă numai mediu mineral (pentru proba martor cu inocul) și, dacă este necesar, soluția comună de substanță de testat/substanță de referință și soluția sterilă.

Dacă substanța de testat este puțin solubilă, se adaugă direct în această etapă în funcție de cantitate sau volum sau este tratată conform descrierii din apendicele 3. Se adaugă hidroxid de potasiu, pelete de hidroxid de calciu sau alt absorbant în compartimentele vasului de absorbție a  $\text{CO}_2$ .

#### V.2.5. Numărul de vase într-un test tipic

Vasele 1 și 2: suspensie de testare

Vasele 3 și 4: proba martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril

Vasul 7: martor de toxicitate

A se vedea, de asemenea, punctul I.6.7.

#### V.2.6. Desfășurarea testului

Se lasă vasele să atingă temperatura dorită, iar apoi se inoculează cu nămol activ preparat sau cu altă sursă de inocul, pentru a obține o concentrație de solide în suspensie nu mai mare de 30 mg/litru. Se assemblează echipamentul, se pornește agitatorul, se verifică etanșarea și se pornește măsurarea consumului de oxigen. De obicei, nu este necesară altă supraveghere în afara citirilor și verificărilor zilnice pentru a urmări menținerea unei temperaturi corecte și unei agitări adecvate.

Se calculează consumul de oxigen din citirile efectuate la intervale regulate și frecvente, folosind metodele date de producătorul echipamentului. La sfârșitul incubării, în mod normal după 28 zile, se măsoară pH-ul soluțiilor din vase, în special în cazul în care consumurile de oxigen sunt scăzute sau mai mici decât  $\text{CTO}_{\text{NH}_4}$  (pentru compuși care conțin azot).

**▼B**

Dacă este necesar, se prelevează probe inițiale și finale din vasele respirometrului, pentru analiza COD sau dozarea substanței (a se vedea apendicele 2 punctul 4). După prelevarea inițială, se înregistrează volumul suspensiei rămasă în vas. Când oxigenul este consumat de substanța de testat ce conține azot, se determină creșterea concentrației de nitrit și nitrat după 28 zile și se calculează corecția pentru oxigenul consumat prin nitrificare (apendicele 5).

### V.3. DATE ȘI RAPORT

#### V.3.1. Interpretarea rezultatelor

Se împarte consumul de oxigen (mg) al substanței de testat după un timp dat (corectat cu acela al probei martor cu inocul după același timp) la cantitatea de substanță folosită. Rezultă CBO exprimat ca mg oxigen/mg substanță testată, după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ consumat de substanța de testare} - \text{mg O}_2 \text{ consumat de blanc})}{(\text{mg substanța de testare în vas})}$$

Procentul de biodegradare se calculează din:

$$\% \text{ biodegradare} = \% \text{ CTO} = \frac{\% \text{ CBO}((\text{mg O}_2/\text{mg substanță}))}{\text{CTO}((\text{mg O}_2/\text{substanță}))} \times 100$$

sau din:

$$\% \text{ CCO} = \frac{\% \text{ CBO}((\text{mg O}_2/\text{mg substanță}))}{\text{CCO}((\text{mg O}_2/\text{substanță}))} \times 100$$

Trebuie remarcat că aceste două metode nu dau în mod necesar aceeași valoare; este preferabil să fie folosită prima metodă.

Pentru substanțele de testat ce conțin azot, se folosește CTO adecvat ( $\text{NH}_4$  sau  $\text{NO}_3$ ), în conformitate cu datele cunoscute sau anticipate cu privire la incidența nitrificării (apendicele 2 punctul 2). Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, se calculează corecția pentru oxigenul consumat prin nitrificare din schimbarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

În cazul în care se fac determinări opționale ale carbonului organic și/sau ale unei substanțe specifice, se calculează degradarea procentuală, conform descrierii de la punctul I.7.

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date anexate.

#### V.3.2. Validarea rezultatelor

Consumul de oxigen al martorului cu inocul este în mod normal de 20-30 mg  $\text{O}_2$ /litru și nu este mai mare de 60 mg/litru în 28 zile. Valorile mai mari de 60 mg/litru necesită un examen critic al datelor și tehnicilor experimentale. Dacă valoarea pH-ului este în afara intervalului 6-8,5 iar consumul de oxigen de către substanța chimică de testat este mai mic de 60 %, testul se repetă cu o concentrație mai mică a substanței de testat.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

[illegible]

**▼ B**

|   |                                  | Ziua |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|---|----------------------------------|------|--|---|--|----|--|--|----|--|--|----|--|
|   |                                  | 0    |  | 7 |  | 14 |  |  | 21 |  |  | 28 |  |
| % degradare<br>$\frac{CBO}{CTO} \times 100$ | D <sub>1</sub> (a <sub>1</sub> ) |      |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|   | D <sub>2</sub> (a <sub>2</sub> ) |      |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|   | Media (*)                        |      |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |

V = volumul mediului mineral din vasul de testare

(\*) D<sub>1</sub> și D<sub>2</sub> nu se exprimă ca medie dacă există o diferență considerabilă.

N.B.: Formate similare pot fi folosite pentru substanța de referință și pentru martorii de toxicitate.

#### 6. CORECȚIA PENTRU NITRIFICARE (a se vedea apendicele 5)

| Ziua                                      |  | 0 | 28 | Diferența |
|---|--|---|----|-----------|
| (i)                                       | Concentrația de nitrat (mg N/litru)                      |   |    | (N)       |
| (ii)                                      | Echivalentul de oxigen ( $4,57 \times N \times V$ ) (mg) | — | —  |           |
| (iii)                                     | Concentrația de nitrat (mg N/litru)                      |   |    | (N)       |
| (iv)                                      | Echivalentul de oxigen ( $3,43 \times N \times V$ ) (mg) | — | —  |           |
| (ii) + (iv) Echivalentul oxigenului total |  | — | —  |           |

#### 7. ANALIZA CARBONULUI (opțional)

Analizorul de carbon:

| Timpul (zile) | Proba martor mg/litru | Substanța de testat mg/litru |
|---------------|-----------------------|------------------------------|
| 0             | (C <sub>blo</sub> )   | (C <sub>o</sub> )            |
| 28 (*)        | (C <sub>blt</sub> )   | (C <sub>t</sub> )            |

(\*) sau la sfârșitul incubării

$$\% \text{ COD eliminat} = \left( 1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b0}} \right) \times 100$$

#### 8. SUBSTANȚA SPECIFICĂ (opțional)

S<sub>b</sub> = concentrația în controlul fizico-chimic (steril) după 28 zile

S<sub>a</sub> = concentrația în vasul inoculat după 28 zile

$$\% \text{ biodegradare} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

#### 9. DEGRADARE ABIOTICĂ (opțional)

a = consumul de oxigen din vasul steril după 28 zile, (mg)

$$\text{consumul de oxigen pe mg substanță de testat} = \frac{a}{C_o V}$$



**▼B**

(a se vedea punctele 1 și 3)

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

## PARTEA VI – TESTUL CU VAS ÎNCHIS (Metoda C.4-E)

### VI.1. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Soluția de substanță de testat în mediu mineral, de obicei 2-5 mg/litru, se inoculează cu un număr relativ mic de microorganisme dintr-o populație bacteriană mixtă, în vase de testare complet pline, închise, ținute la întuneric, la temperatură constantă. Degradarea este urmată de analiza oxigenului dizolvat după o perioadă de 28 zile. Cantitatea de oxigen consumată de către substanța de testat, corectată cu consumul din proba martor cu inocul, testat în paralel, se exprimă ca procent de CTO sau CCO.

### VI.2. DESCRIEREA METODEI

#### VI.2.1. Aparatură

- (a) vase CBO, cu dopuri de sticlă, de exemplu de 250-300 ml;
- (b) baie de apă sau incubator, pentru păstrarea vaselor la temperatură constantă ( $\pm 1$  °C sau mai precis) și la întuneric;
- (c) vase mari (2-5 litri) pentru prepararea mediului și pentru umplerea vaselor CBO;
- (d) oxigenometru sau echipament și reactivi pentru titrarea Winkler.

#### VI.2.2. Prepararea mediului mineral

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă câte 1 ml din soluțiile (a)-(d) și se aduce la 1 litru cu apă de diluție.

#### VI.2.3. Prepararea inoculului

Inoculul provine în mod normal din efluentul secundar al instalației de epurare sau din sedimentul provenit predominant de la apa uzată menajeră. O sursă alternativă de inocul este apa de suprafață. În mod normal, se folosește de la o picătură (0,05 ml) până la 5 ml de filtrat pe litru de mediu; pot fi necesare experimentări pentru a determina volumul optim pentru un efluent dat (a se vedea punctele I.6.4.2 și I.6.5).

#### VI.2.4. Pregătirea vaselor

Se aerează puternic mediul mineral timp de cel puțin 20 min. Fiecare serie de teste se efectuează cu mediu mineral provenit din același lot. În general, mediul este gata pentru folosire după păstrarea sa la temperatura de testare timp de 20 ore. Se determină concentrația oxigenului dizolvat pentru control; valoarea va fi de aproximativ 9 mg/litru la 20 °C. Toate operațiile de transfer și umplere se efectuează într-un mediu saturat cu oxigen, fără barbotare, prin folosirea sifoanelor.

**▼B**

Se pregătesc grupuri paralele de vase CBO cu substanță de testat și de referință pentru determinări în serii experimentale simultane. Se montează un număr suficient de vase CBO, inclusiv proba martor cu inocul, pentru a permite ca măsurătorile duplicate ale consumului de oxigen să fie făcute la intervalele de timp dorite, de exemplu, după 0, 7, 14, 21 și 28 de zile. Pentru a fi posibilă identificarea ferestrei de 10 zile, se folosesc mai multe vase.

Vasele mari se umplu o treime cu mediu mineral aerat. Apoi se adaugă soluții mamă de substanță testată și de referință în vase mari separate, în cantități suficiente pentru a obține o concentrație finală a substanțelor mai mică de 10 mg/litru. Nu se adaugă nicio substanță la mediul probei martor cu inocul, conținut într-un alt vas mare.

Pentru a nu limita activitatea inoculului, concentrația oxigenului dizolvat nu trebuie să scadă sub 0,5 mg/litru în vasele CBO. Aceasta limitează concentrația substanței de testat la aproximativ 2 mg/litru. Cu toate acestea, pentru compuși puțin degradabili și pentru aceia cu un CTO mic, se pot folosi 5-10 mg/litru. În unele cazuri, se recomandă să se efectueze serii paralele cu substanță de testat la două concentrații diferite, de exemplu, 2 și 5 mg/litru. În mod normal, se calculează CTO pe baza formării sărurilor de amoniu dar, dacă se presupune sau se știe că are loc nitrificarea, se calculează pe baza formării nitratului (CTO<sub>NO<sub>3</sub></sub>; a se vedea apendicele 2 punctul 2). Cu toate acestea, dacă nitrificarea nu este completă, dar are loc, se corectează cu modificările în concentrațiile de nitrit și de nitrat, determinate prin analiză (a se vedea apendicele 5).

Dacă trebuie determinată toxicitatea substanței de testat (de exemplu, în cazul în care au fost găsite anterior valori de biodegradabilitate scăzute), este necesară o altă serie de vase.

Se pregătește un alt vas mare ce conține mediu mineral aerat (aproximativ o treime din volumul său) plus substanță de testat și substanță de referință la aceleași concentrații finale ca și celea din celelalte vase mari.

Se inoculează soluțiile din vasele mari cu efluent secundar (de la o picătură sau aproximativ 0,05 ml până la 5 ml/litru) sau cu o altă sursă cum ar fi apă de râu (a se vedea punctul I.6.4.2). În final, se aduc soluțiile la volum cu mediu mineral aerat folosind un furtun care ajunge la fundul vasului pentru a realiza o amestecare adecvată.

#### VI.2.5. Numărul de vase într-un test tipic

Într-un test tipic sunt folosite următoarele vase:

- cel puțin 10 conținând substanță de testat și inocul (suspensia de testare);
- cel puțin 10 conținând numai inocul (proba martor cu inocul);
- cel puțin 10 conținând substanța de referință și inocul (martor de metodă);

▼ B

- și, dacă este necesar, 6 vase conținând substanță de testat, substanță de referință și inocul (martor de toxicitate). În plus, pentru a fi posibilă identificarea ferestrei de 10 zile, sunt necesare aproape de două ori mai multe vase.

## VI.2.6. Desfășurarea testului

Fiecare soluție preparată se distribuie imediat în vasele CBO din grupul respectiv, prin furtun, din sfertul inferior (nu la bază) al vasului mare corespunzător, astfel încât toate vasele CBO să fie complet umplute. Se lovesc ușor pentru a îndepărta bulele de aer. Se analizează imediat, la momentul zero, oxigenul dizolvat din vase, prin metoda Winkler sau prin metoda electrodului. Conținutul vaselor poate fi păstrat pentru a fi analizat mai târziu, prin metoda Winkler, prin adăugarea de sulfat de magneziu (II) și de hidroxid de sodiu (primul reactiv Winkler). Se depozitează vasele închise cu grijă, ce conțin oxigen fixat ca oxid brun de magneziu (III) hidratat, la întuneric, la 10-20 °C, timp de cel mult 24 de ore, înainte de efectuarea etapelor rămase ale metodei Winkler. Se astupă cu dop vasele replicate rămase, urmărind să nu fie incluse bule de aer, și se incubează la 20 °C, la întuneric. Fiecare serie experimentală este însoțită de o serie paralelă completă, pentru determinarea probei martor inoculate. Se prelevează probe din vasele duplicate, din toate seriile, pentru analiza oxigenului dizolvat la intervale egale de timp (cel puțin săptămânal), de-a lungul celor 28 zile de incubare.

Probele prelevate săptămânal permit evaluarea procentului de eliminare în fereastra de 14 zile, în timp ce prelevarea de probe la 3-4 zile permite identificarea ferestrei de 10 zile, care necesită dublarea numărului celor mai multe vase.

Pentru substanțele de testat care conțin azot, se fac corecții ale consumului de oxigen necesar oricărei nitrificări care ar avea loc. În acest scop, se folosește metoda electrodului de O<sub>2</sub> pentru determinarea concentrației oxigenului dizolvat și apoi se prelevează o probă din vasul CBO pentru analiza nitritului și nitratului. Din creșterea concentrației de nitrit și nitrat se calculează oxigenul folosit (a se vedea apendicele 5).

## VI.3. DATE ȘI RAPORT

## VI.3.1. Interpretarea rezultatelor

Mai întâi se calculează CBO la fiecare interval, scăzând cantitatea de oxigen consumat (mg O<sub>2</sub>/litru) de proba martor cu inocul din cantitatea consumată de substanța de testat. Se împarte acest consum corectat la concentrația substanței de testat (mg/litru), pentru a obține CBO specific ca mg oxigen pe mg substanță testată. Se calculează procentul de biodegradabilitate prin împărțirea CBO specific la CTO specific (calculat în conformitate cu apendicele 2 punctul 2) sau CCO (determinat prin analiză, a se vedea apendicele 2 punctul 3), după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ consumat de substanță de testat} - \text{mg O}_2 \text{ consumat de proba martor})}{(\text{substanță de testat în vas})}$$

**▼B**

= mg O<sub>2</sub> pe mg substanță de testat

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{CBO} ((\text{mg O}_2/\text{mg substanță}))}{\text{CTO}((\text{mg O}_2/\text{mg substanță}))} \times 100$$

sau

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{CBO} (\text{mg O}_2/\text{mg substanță})}{\text{CCO}(\text{mg O}_2/\text{mg substanță})} \times 100$$

Trebuie remarcat că aceste două metode nu conduc în mod necesar la aceeași valoare; este preferabil să se utilizeze prima metodă.

Pentru substanțele de testat ce conțin azot, se folosește CTO (NH<sub>4</sub> sau NO<sub>3</sub>) în funcție de datele cunoscute sau anticipate privind incidența nitrificării (apendicele 2 punctul 2). Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, se calculează corecția pentru oxigenul consumat la nitrificare din modificarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

#### VI.3.2. Validarea rezultatelor

Scăderea conținutului de oxigen în martorul cu inocul nu trebuie să depășească 1,5 mg oxigen dizolvat/litru, după 28 zile. Valorile mai mari decât aceasta impun investigarea tehnicilor experimentale. Concentrațiile reziduale de oxigen din vasele de testare nu trebuie în niciun moment să scadă sub 0,5 mg/litru. Astfel, nivele de oxigen mai scăzute sunt valide numai dacă metoda de determinare a oxigenului dizolvat folosită este capabilă de măsurarea cu precizie a unor astfel de niveluri de concentrație.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

#### VI.3.3. Raport

A se vedea punctul I.8.

#### VI.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

##### TEST ÎN VAS ÎNCHIS

##### 1. LABORATOR

##### 2. DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI

##### 3. SUBSTANȚA DE TESTAT

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/litru

Concentrația inițială în vas: mg/litru

CTO sau CCO: mg O<sub>2</sub>/mg substanță testată

##### 4. INOCUL

Sursă:

Tratamentul aplicat:

**▼B**

Precondiționare, dacă există:

Concentrația în amestecul de reacție: mg/litru

**5. DETERMINAREA OD**

Metoda: Winkler/electrod

**Analizele vaselor**

| Timpul de incubare (zile)     |                             |                | OD (mg/l) |                |                |  |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|----------------|----------------|--|
|                               |                             |                | 0         | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> |  |
| Proba martor (fără substanță) | 1                           | C <sub>1</sub> |           |                |                |  |
|                               | 2                           | C <sub>2</sub> |           |                |                |  |
| Media                         | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ |                |           |                |                |  |
| Substanța de testat           | 1                           | a <sub>1</sub> |           |                |                |  |
|                               | 2                           | a <sub>2</sub> |           |                |                |  |
| Media                         | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ |                |           |                |                |  |

Notă: Un format similar poate fi folosit pentru substanța de referință și martorul de toxicitate.

**6. CORECȚIA PENTRU NITRIFICARE** (a se vedea apendicele 5)

| Timpul de incubare (zile) |  | 0 | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> |
|---------------------------|--|---|----------------|----------------|----------------|
| (i)                       | Concentrația de nitrat (mg N/litru)              |   |                |                |                |
| (ii)                      | Modificarea concentrației de nitrat (mg N/litru) | — |                |                |                |
| (iii)                     | Echivalentul de oxigen (mg/litru)                | — |                |                |                |
| (iv)                      | Concentrația de nitrit (mg N/litru)              |   |                |                |                |
| (v)                       | Modificarea concentrației de nitrat (mg N/litru) | — |                |                |                |
| (vi)                      | Echivalentul de oxigen (mg/litru)                | — |                |                |                |
| (iii) + (vi)              | Echivalentul de oxigen total (mg/litru)          | — |                |                |                |

**7. CONSUM DE OD: % DEGRADARE**

|  | Îndepărtarea după n zile (mg/litru) |                |                |  |
|--|-------------------------------------|----------------|----------------|--|
|  | n <sub>1</sub>                      | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> |  |
| VAS 1: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> ) |                                     |                |                |  |
| VAS 2: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> ) |                                     |                |                |  |

**▼B**

|  | Îndepărtarea după n zile (mg/litru) |                |                |  |
|--|-------------------------------------|----------------|----------------|--|
|  | n <sub>1</sub>                      | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> |  |
| VAS 1<br>$\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{CTO subst}}$ |                                     |                |                |  |
| VAS 2<br>$\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{CTO subst}}$ |                                     |                |                |  |
| $\% \text{ medie (*)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$   |                                     |                |                |  |

(\*) Nu se va lua în considerare media dacă este o diferență considerabilă între replici.

$m_{t0}$  = valoarea în vasul de testare la momentul 0

$m_{tx}$  = valoarea în vasul de testare la momentul x

$m_{b0}$  = valoarea medie a probei martor la momentul 0

$m_{bx}$  = valoarea medie a probei martor la momentul x

Se aplică, de asemenea, corecții pentru nitrificare la punctul (iii) + (vi) în punctul 6.

## 8. CONSUM DE OD ÎN PROBA MARTOR

Consumul de oxigen al probei martor: ( $m_{b0} - m_{b28}$ ) mg/litru.  
Consumul este important pentru validarea testului. El trebuie să fie mai mic de 1,5 mg/litru.

## PARTEA VII – TESTUL MITI (METODA C.4-F)

### VII.1. PRINCIPIUL METODEI

Consumul de oxigen al soluției sau al suspensiei sub agitare de substanță de testat în mediu mineral, inoculată cu microorganisme mature, neadaptate, se măsoară automat după o perioadă de 28 zile într-un respirometru cu circuit închis, la întuneric, la  $25 \pm 1$  °C. Dioxidul de carbon degajat este absorbit în calce sodică. Biodegradabilitatea este exprimată ca procent de oxigen absorbit (corectat cu absorbția în proba martor) față de absorbția teoretică (CTO). Procentul biodegradabilității primare se calculează de asemenea din analiza chimică specifică suplimentară realizată la începutul și la sfârșitul incubării și, opțional, prin analiza COD.

### VII.2. DESCRIEREA METODEI

#### VII.2.1. Aparatură

- (a) aparat automat de măsurare electrolică a CBO sau respirometru normal echipat cu 6 vase de 300 ml fiecare și cu capsule ce conțin absorbant de CO<sub>2</sub>;

**▼B**

- (b) cameră cu temperatură constantă și/sau baie de apă la  $25 \pm 1$  °C sau mai mult;
- (c) dispozitiv de filtrare cu membrană (opțional);
- (d) analizor de carbon (opțional).

**VII.2.2. Prepararea mediului mineral**

Se prepară următoarele soluții mamă, folosind reactivi puri pentru analiză și apă (I.6.1):

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
| (a) | Ortofosfat diacid de potasiu, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 8,50 g  |
|     | Ortofosfat monoacid de potasiu, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  | 21,75 g |
|     | Ortofosfat monoacid de sodiu dodecahidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
|     | Clorură de amoniu, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 1,70 g  |
|     | Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.   |         |
|     | Valoarea pH-ului soluției va fi de 7,2.   |         |
| (b) | Sulfat de magneziu heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$                       | 22,50 g |
|     | Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.   |         |
| (c) | Clorură de calciu anhidră, $\text{CaCl}_2$  | 27,50 g |
|     | Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.   |         |
| (d) | Clorură de fier (III) hexahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$                     | 0,25 g  |
|     | Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.   |         |

Se iau 3 ml din fiecare soluție (a), (b), (c) și (d) și se aduce soluția la 1 litru.

**VII.2.3. Prepararea inoculului**

Se prelevează probe proaspete din cel puțin zece locuri, în principal din ariile unde sunt folosite și descărcate diferite substanțe chimice. Din locuri cum ar fi instalații de tratare a nămolurilor, stații de epurare ale apelor uzate industriale, râuri, lacuri, mări, se prelevează probe de 1 l de nămol, sol de suprafață, apă etc. și se amestecă bine. După îndepărtarea materiilor plutitoare și după decantare, se reglează pH-ul supernatantului la  $7 \pm 1$  cu hidroxid de sodiu sau acid fosforic.

Se folosește un volum adecvat de supernatant filtrat pentru a umple cu nămol activ un vas de încărcare-descărcare și se aerează lichidul aproximativ 23 1/2 h. După treizeci de minute de la oprirea aerării se îndepărtează aproximativ o treime din întregul volum al supernatantului și se adaugă la materialul sedimentat un volum egal de soluție (pH 7) ce conține 0,1 % glucoză, 0,1 % peptonă și 0,1 % ortofosfat diacid de potasiu și se reîncepe aerarea. Se repetă această procedură o dată pe zi. Operarea instalației cu nămol se face conform bunelor practici de laborator: efluenții sunt limpezi, temperatura este menținută la  $25 \pm 2$  °C, pH-ul este  $7 \pm 1$ , nămolul sedimentează bine, există suficientă aerare pentru a păstra amestecul în condiții aerobe tot timpul, protozoarele sunt prezente și activitatea nămolului este testată față de o substanță de referință cel puțin la fiecare trei luni. Nu se folosește nămolul ca inocul decât după cel puțin o lună de întreținere, dar nu după mai mult de patru luni. Prin urmare, se vor preleva probe din cel puțin 10 locuri la intervale egale, o dată la trei luni.

**▼B**

Pentru a menține nămolul proaspăt și pe cel vechi la aceeași activitate, se amestecă supernatantul filtrat de la nămolul activ în uz cu un volum egal de supernatant filtrat de la un amestec proaspăt prelevat din zece surse și se cultivă lichidul combinat ca mai sus. Se prelevează nămol pentru folosire ca inocul după 18-24 de ore de la alimentarea instalației.

**VII.2.4. Pregătirea vaselor**

Se pregătesc următoarele șase vase, astfel încât să conțină:

Nr. 1: substanța de testat în apă de diluție la 100 mg/l

Nr. 2, 3 și 4: substanța de testat în mediu mineral la 100 mg/l

Nr. 5: substanța de referință (de exemplu anilină) în mediu mineral la 100 mg/l

Nr. 6: numai mediu mineral

Substanțele de testat greu solubile se adaugă direct, în funcție de cantitate sau de volum, sau se tratează conform descrierii din apendicele 3, excepție făcând faptul că nu se folosesc solvenți și nici agenți de emulsionare. Se adaugă la toate vasele absorbant de CO<sub>2</sub> în capsulele speciale prevăzute în acest scop. Se reglează pH-ul din vasele 2, 3 și 4 la valoarea de 7,0.

**VII.2.5. Efectuarea testului**

Se inoculează vasele nr. 2, 3 și 4 (cu suspensie de testare), nr. 5 (martor de activitate) și nr. 6 (probă martor cu inocul) cu un mic volum de inocul pentru a rezulta o concentrație de 30 mg/l de solide în suspensie. Nu se adaugă inocul vasului nr. 1 care servește drept martor abiotic. Se montează echipamentul, se verifică etanșeitățile, se pornește agitarea și se încep măsurătorile de consum de oxigen la întuneric. Zilnic se verifică temperatura, agitatorul și înregistratorul oxigenului consumat și se notează orice schimbare a culorii conținutului vaselor. Se citește direct consumul de oxigen la șase vase, printr-o metodă adecvată, de exemplu, prin intermediul unui înregistrator cu diagramă cu șase puncte, care furnizează curba CBO. La sfârșitul incubării, în mod normal după 28 zile, se măsoară pH-ul conținutului vaselor și se determină concentrația substanței de testat rămasă și a oricărui intermediar și, în cazul substanțelor solubile în apă, concentrația de COD (apendicele 2 punctul 4). Este necesară o atenție deosebită în cazul substanțelor volatile. Dacă se anticipează nitrificarea, se determină concentrația de nitrat și de nitrit, dacă este posibil.

**VII.3. DATE ȘI RAPORT****VII.3.1. Interpretarea rezultatelor**

Se împarte consumul de oxigen (mg) al substanței de testat, corectat cu acela citit la proba martor cu inocul după același timp, la cantitatea substanței de testat folosită. Rezultă CBO, exprimat ca mg oxigen/mg substanță testată, după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ consumat de substanță de testat} - \text{mg O}_2 \text{ consumat de proba martor})}{(\text{mg substanță de testat în vas})}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ pe mg substanță de testat}$$



**▼ B**

Procentul de biodegradare se obține apoi din:

$$\% \text{ biodegradare} = \% \text{ CTO} = \frac{\text{CBO (mg O}_2\text{/mg substanță)}}{\text{CTO (mg O}_2\text{/mg substanță)}} \times 100$$

Pentru amestecuri se calculează CTO din analiza elementară, ca și pentru compuși simpli. Se folosește CTO adecvat (CTO<sub>NH4</sub> sau CTO<sub>NO3</sub>) dacă nitrificarea este absentă sau este completă (apendicele 2 punctul 2). Dacă totuși nitrificarea are loc, dar este incompletă, se face o corecție pentru consumul de oxigen la nitrificare, calculat din modificarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

Se calculează procentul de biodegradare primară cu ajutorul pierderii de substanță chimică inițială (a se vedea punctul I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Dacă s-a înregistrat o pierdere de substanță în vasul nr. 1, care măsoară eliminarea fizico-chimică, această constatare se consemnează și se folosește concentrația de substanță ( $S_b$ ) după 28 zile din acest vas pentru a se calcula biodegradarea procentuală.

Când se fac determinări de COD (opțional), se calculează biodegradarea procentuală finală din:

$$D_t = \left( 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

conform descrierii de la punctul I.7.1. Dacă s-a înregistrat o pierdere de COD în vasul nr. 1, care măsoară eliminarea fizico-chimică, concentrația de COD din acest vas se folosește pentru a calcula biodegradarea procentuală.

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date atașate.

### VII.3.2. Validarea rezultatelor

Consumul de oxigen în proba martor cu inocul este în mod normal 20-30 mg O<sub>2</sub>/l și nu trebuie să fie mai mare de 60 mg/l în timpul celor 28 de zile. Valorile mai mari de 60 mg/l necesită un examen critic al datelor și al tehnicilor experimentale. Dacă valoarea pH-ului este în afara intervalului 6-8,5 și consumul de oxigen al substanței de testat este mai mic de 60 %, testul se repetă cu o concentrație mai mică a substanței.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

Dacă procentul de degradare al anilinei, calculat din consumul de oxigen, nu depășește 40 % după 7 zile și 65 % după 14 zile, testul este invalidat.

### VII.3.3. Raport

A se vedea punctul I.8.

### VII.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

#### TESTUL MITI (I)

#### 1. LABORATORUL

#### 2. DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI

**▼B****3. SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță de testat

Concentrația inițială în mediul mineral,  $C_0$ : mg/l substanță de testat

Volumul amestecului de reacție, V: ml

CTO: mg  $O_2$ /l**4. INOCUL**

Locurile de prelevare a probelor de nămol:

- |        |         |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ...  |
| 2) ... | 7) ...  |
| 3) ... | 8) ...  |
| 4) ... | 9) ...  |
| 5) ... | 10) ... |

Concentrația materiilor solide în suspensie în nămolul activ după aclimatizare cu apă uzată sintetică = ... mg/l

Volumul de nămol activ pe litru de mediu mineral final = ...ml

Concentrația de nămol în mediul mineral final = ...mg/l

**5. CONSUMUL DE OXIGEN: BIODEGRADABILITATEA**

Tipul de respirometru folosit:

|   |   |           | Ziua |   |    |    |    |
|---|---|-----------|------|---|----|----|----|
|   |   |           | 0    | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Consumul de $O_2$ la substanța de testat    | $a_1$                                     |           |      |   |    |    |    |
|   | $a_2$                                     |           |      |   |    |    |    |
|   | $a_3$                                     |           |      |   |    |    |    |
| Consumul de $O_2$ (mg) la proba martor      | b   |           |      |   |    |    |    |
| Consumul de $O_2$ (mg) corectat             | $(a_1 - b)$<br>$(a_2 - b)$<br>$(a_3 - b)$ |           |      |   |    |    |    |
| CBO/mg substanță de testat                  | $\frac{(a - b)}{C_0 V}$                   | Vas 1     |      |   |    |    |    |
|   |   | Vas 2     |      |   |    |    |    |
|   |   | Vas 3     |      |   |    |    |    |
| % degradare<br>$\frac{CBO}{CTO} \times 100$ |   | 1         |      |   |    |    |    |
|   |   | 2         |      |   |    |    |    |
|   |   | 3         |      |   |    |    |    |
|   |   | media (*) |      |   |    |    |    |

(\*) Nu se face o medie dacă sunt diferențe considerabile între replici.

**▼B**

Notă: Formate similare pot fi folosite pentru substanța de referință.

#### 6. ANALIZA DE CARBON (opțional)

Analizorul de carbon:

| Vas                         | COD            |  |                    |  | Îndepărat<br>% COD | Media |
|-----------------------------|----------------|--|--------------------|--|--------------------|-------|
|                             | Măsurat        |  | Corectat           |  |                    |       |
| Apă + substanță de testat   | a              |  |                    |  | —                  | —     |
| Nămol + substanță de testat | b <sub>1</sub> |  | b <sub>1</sub> – c |  |                    |       |
| Nămol + substanță de testat | b <sub>2</sub> |  | b <sub>2</sub> – c |  |                    |       |
| Nămol + substanță de testat | b <sub>3</sub> |  | b <sub>3</sub> – c |  |                    |       |
| Probă martor cu inocul      | c              |  | —                  |  | —                  | —     |

$$\% \text{ COD eliminat} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

#### 7. DATE ANALITICE SPECIFICE SUBSTANȚEI

|                     | Cantitatea rămasă de substanță de testat<br>la sfârșitul testului | % de degradare |
|---------------------|---|----------------|
| probă martor cu apă | S <sub>b</sub>  |                |
| mediu inoculat      | S <sub>a1</sub>   |                |
|                     | S <sub>a2</sub>   |                |
|                     | S <sub>a3</sub>   |                |

$$\% \text{ degradare} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Se calculează % degradare pentru vasele a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> și a<sub>3</sub>.

#### 8. OBSERVAȚII

Se atașează curba CBO în funcție de timp, dacă este disponibilă.

**▼B***Apendicele 1***ABREVIERI ȘI DEFINIȚII**

- OD: Oxigenul dizolvat (mg/l) este concentrația de oxigen dizolvat într-o probă de apă.
- CBO: Consumul biochimic de oxigen (g) este cantitatea de oxigen consumată de microorganisme când se metabolizează un compus de testat; de asemenea, se exprimă în g de oxigen consumat pe g substanță testată (a se vedea metoda C.5).
- CCO: Consumul chimic de oxigen (g) este cantitatea de oxigen consumată în timpul oxidării unui compus de testat cu dicromat acid fierbinte; el furnizează o măsură a cantității prezente de materie oxidabilă; se exprimă și ca g oxigen consumat pe g compus de testat (a se vedea metoda C.6).
- COD: Carbonul organic dizolvat este carbonul organic prezent în soluție sau acela care trece printr-un filtru de 0,45 microni sau rămâne în supernatant după centrifugare la  $40\,000\text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$  ( $\pm 4\,000\text{ g}$ ) timp de 15 min.
- CTO: Consumul teoretic de oxigen (mg) este cantitatea totală de oxigen necesară pentru a oxida complet substanța; este calculat din formula moleculară (a se vedea apendicele 2 punctul 2) și este de asemenea exprimat ca mg oxigen necesar pe mg compus de testat.
- CO<sub>2</sub>T: Cantitatea teoretică de dioxid de carbon (mg) este cantitatea de dioxid de carbon calculată din conținutul de carbon cunoscut sau măsurat al compusului de testat când acesta este complet mineralizat; se exprimă și ca mg dioxid de carbon degajat pe mg substanță.
- COT: Carbonul organic total al probei este suma carbonului organic în soluție și în suspensie.
- CA: Carbonul anorganic
- CT: Carbonul total este suma carbonului organic și anorganic prezent în eșantion.

*Biodegradarea primară:*

este modificarea structurii chimice a substanței, produsă prin acțiune biologică, care are ca rezultat pierderea proprietăților specifice ale substanței.

*Biodegradarea finală (aerobică):*

este nivelul de degradare realizat când substanța de testat este complet folosită de microorganisme având ca rezultat producerea de dioxid de carbon, apă, săruri minerale și noi constituenți celulari microbieni (biomasă).

*Ușor biodegradabil:*

o clasificare arbitrară a substanțelor care au trecut anumite teste de screening specificate pentru biodegradabilitatea finală; aceste teste sunt atât de riguroase încât se admite că asemenea compuși se vor degrada biologic rapid și complet în medii acvatice în condiții aerobe.

**▼B***Intrinsec biodegradabil:*

o clasificare a substanțelor pentru care există probe neechivoce de biodegradare (primară sau finală) în orice test de biodegradabilitate recunoscut.

*Tratabilitate:*

este capacitatea substanțelor de a fi eliminate în timpul tratamentului biologic al apelor reziduale fără a afecta negativ funcționarea normală a procesului de tratare. În general, compușii ușor biodegradabili sunt tratabili, dar nu este cazul tuturor sunt compuși intrinsec biodegradabili. Se pot produce, de asemenea, și procese abiotice.

*Timpul de latență*

este timpul de la inoculare, în testul de epuizare, până când procentul de degradare crește cel puțin până la 10 %. Timpul de latență este adesea foarte variabil și slab reproductibil.

*Timpul de degradare*

este timpul de la sfârșitul perioadei de latență până în momentul în care se atinge 90 % din nivelul maxim de degradare.

*Fereastra de 10 zile*

este intervalul de 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % degradare.



## Appendicele 2

### CALCULAREA ȘI DETERMINAREA UNOR PARAMETRI SINTETICI ADECVAȚI

În funcție de metoda aleasă, sunt necesari anumiți parametri sintetici. Următoarea secțiune descrie modul de obținere a acestor valori. Folosirea acestor parametri este descrisă la fiecare metodă.

#### 1. Conținutul de carbon

Conținutul de carbon se calculează din compoziția elementară cunoscută sau determinată din analiza elementară a substanței de testat.

#### 2. Consumul teoretic de oxigen (CTO)

Consumul teoretic de oxigen (CTO) poate fi calculat dacă este cunoscută compoziția elementară sau este determinată prin analiză elementară. Acesta este, pentru compusul



fără nitrificare,

$$CTO_{NH_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

sau cu nitrificare,

$$CTO_{NO_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

#### 3. Consumul chimic de oxigen (CCO)

Consumul chimic de oxigen (CCO) se determină în conformitate cu metoda C.6.

#### 4. Carbonul organic dizolvat (COD)

Carbonul organic dizolvat (COD) este prin definiție carbonul organic al unei substanțe sau al unui amestec în apă care trece prin filtrul de 0,45 micrometri.

Se iau probe din vasele de testare și se filtrează imediat în aparatul de filtrare, folosind un filtru cu membrana adecvată. Primii 20 ml (cantitatea poate fi redusă când se folosesc filtre mici) de filtrat sunt eliminați. Volume de 10-20 ml sau mai mici, dacă sunt injectate (volumul depinde de cantitatea necesară la analizorul de carbon) sunt reținute pentru analiza carbonului. Concentrația COD se determină cu ajutorul unui analizor de carbon organic care poate măsura exact o concentrație de carbon echivalentă sau mai mică de 10 % din concentrația inițială de COD folosită la test.

Probele filtrate care nu pot fi analizate în aceeași zi de lucru pot fi păstrate la frigider, la 2-4°C, timp de 48 de ore sau sub - 18 °C pentru perioade mai lungi.

#### Observații:

Filtrele cu membrană sunt adesea impregnate cu agenți tensioactivi pentru hidrofilizare. Astfel, filtrul poate conține mai mult de câteva mg de carbon organic solubil care interferează cu determinările de biodegradabilitate. Agenții tensioactivi și alți compuși organici solubili sunt îndepărtați din filtre prin fierbere în apă deionizată timp de trei perioade a câte o oră fiecare. Filtrele pot fi apoi depozitate în apă timp de o săptămână. Dacă se folosesc cartușe de filtrare, fiecare lot trebuie verificat pentru a confirma că nu eliberează carbon organic solubil.

**▼B**

În funcție de tipul membranei de filtrare, substanța de testat poate fi reținută prin adsorbție. Prin urmare, este recomandabil să se ia măsuri pentru ca substanța să nu fie reținută pe filtru.

*Centrifugarea* la  $40\,000\text{ m} \cdot \text{sec}^{-2}$  (4 000 g) timp de 15 minute se poate folosi în locul filtrării pentru a face diferența între COT și COD. Metoda nu este viabilă la concentrația inițială de  $< 10\text{ mg COD/l}$  deoarece fie că nu sunt îndepărtate toate bacteriile, fie că este redizolvat carbonul, ca parte a plasmei bacteriene.

*REFERINȚE BIBLIOGRAFICE*

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, p. 139.
- DIN – Entwurf 38 409, Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), p. 169.

*Apendicele 3***EVALUAREA BIODEGRADABILITĂȚII SUBSTANȚELOR PUȚIN SOLUBILE**

În testele de biodegradabilitate aplicate la substanțe puțin solubile, se acordă o deosebită atenție următoarelor aspecte.

Lichidele omogene prezintă rareori probleme de eșantionare, dar în cazul materialelor solide se recomandă omogenizarea cu mijloace adecvate, pentru a evita erorile datorate neomogenității. Se impun precauții speciale în cazul în care sunt necesare eșantioane reprezentative de câteva miligrame din amestecuri sau substanțe cu cantități mari de impurități.

Pot fi folosite diferite forme de agitare în timpul testelor. Se folosește cu atenție numai agitarea suficientă pentru a ține substanța dispersată, evitându-se supraîncălzirea, spumarea excesivă și forțele mari de forfecare.

Poate fi folosit un agent de emulsionare care dă o dispersie stabilă a substanței. Acesta nu trebuie să fie toxic pentru bacterii, biodegradat sau să spumeze în condițiile de testare.

Solvenților li se aplică aceleași criterii ca și agenților de emulsionare.

Nu se recomandă să se folosească purtători solizi pentru substanțele de testat solide, dar pot fi potriviți pentru substanțele uleioase.

Dacă se folosesc substanțe auxiliare cum ar fi agenți de emulsionare, solvenți și purtători, se testează o probă martor ce conține substanța auxiliară.

Unul dintre testele de respirometrie CO<sub>2</sub>, CBO, MITI poate fi folosit pentru a studia biodegradabilitatea substanțelor greu solubile.

*REFERINȚE BIBLIOGRAFICE*

- de Morsier, A. *et al.*, Biodegradation tests for poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 1987, vol. 16, p. 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, vol. 13, p. 169.



*Apendicele 4***EVALUAREA BIODEGRADABILITĂȚII SUBSTANTELOR SUSCEPTIBILE DE A FI TOXICE PENTRU INOCUL**

Când o substanță este supusă testării pentru biodegradabilitate ușoară și pare a fi ne-biodegradabilă, se recomandă următoarea procedură dacă se urmărește distincția între inhibiție și inerție (Reynolds *et al.*, 1987).

Se folosesc inoculi similari sau identici pentru testele de toxicitate și biodegradare.

Pentru a evalua toxicitatea substanțelor studiate în testele de biodegradabilitate ușoară, se aplică una dintre metodele următoare: metoda de inhibiție a vitezei de respirație a nămolului (testul de inhibiție a respirației nămolului activ – Directiva 87/302/CEE), CBO și/sau metodele de inhibiție a creșterii sau a unei combinații între acestea.

Dacă trebuie evitată inhibiția datorată toxicității, se propune ca valoarea concentrației substanței de testat folosită în testul de biodegradabilitate ușoară să fie mai mică decât 1/10 din valoarea  $CE_{50}$  (sau mai mică decât valoarea  $CE_{20}$ ) obținută în testul de toxicitate. Compușii cu un  $CE_{50}$  mai mare de 300 mg/l nu au, probabil, efecte toxice în testul de biodegradabilitate ușoară.

Valorile  $CE_{50}$  mai mici de 20 mg/l probabil pun serioase probleme pentru testările următoare. Se vor folosi concentrații de testare mici, ce necesită folosirea testului în vasului închis, riguros și sensibil, sau folosirea materialului marcat cu C. Ca alternativă, un inocul aclimatizat permite să fie folosite concentrații mai mari ale substanței de testat. În ultimul caz totuși criteriul specific al testului de biodegradabilitate ușoară este pierdut.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Reynolds, L. *et al.*, Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

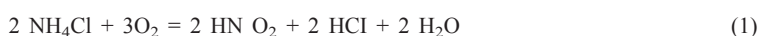


### Apendicele 5

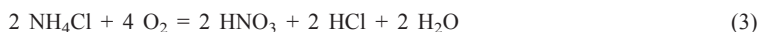
#### CORECȚIA CONSUMULUI DE OXIGEN ÎN CAZUL INTERFERENȚEI CU NITRIFICAREA

Erorile datorate omiterii nitrificării la evaluarea consumului de oxigen necesar pentru biodegradarea substanței de testat care nu conține azot sunt minime (nu mai mari de 5 %), chiar dacă oxidarea azotului amoniacal în mediul de testare se produce ocazional atât în vasele cu substanță de testat, cât și în cele cu probă martor. Cu toate acestea, în cazul substanțelor care conțin azot, pot apărea erori grave.

Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, consumul de oxigen observat al amestecului de reacție poate fi corectat prin cantitatea de oxigen folosită la oxidarea amoniului la nitrit sau la nitrat, dacă modificările concentrației în timpul incubării nitritului și nitratului sunt determinate luând în considerare următoarele ecuații:



Reacția globală este:



Din ecuația (1), consumul de oxigen pentru ca 28 g azot conținut în clorura de amoniu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) să fie oxidat la nitrit este de 96 g, adică un factor de 3,43 (96/28). În același mod, din ecuația (3) rezultă un consum de oxigen de 128 g pentru ca 28 g de azot să fie oxidat la nitrat, adică un factor de 4,57 (128/28).

Deoarece reacțiile sunt succesive, fiind realizate în prezența unor specii distincte și diferite de bacterii, concentrația de nitrit crește sau scade; în ultimul caz se formează o concentrație echivalentă de nitrat. Astfel, cantitatea de oxigen consumată pentru formarea nitratului este de 4,57 înmulțit cu creșterea concentrației de nitrat, în timp ce cantitatea de oxigen asociată cu formarea nitritului este de 3,43 înmulțit cu creșterea concentrației de nitrit sau pierderea de oxigen este de - 3,43 înmulțit cu descreșterea concentrației.

Aceasta este:

$$\text{O}_2 \text{ consumat la formarea nitratului} = 4,57 \times \text{creșterea concentrației de nitrat} \quad (4)$$

și

$$\text{O}_2 \text{ consumat la formarea nitritului} = 3,43 \times \text{creșterea concentrației de nitrit} \quad (5)$$

și

$$\text{O}_2 \text{ consumat la dispariția nitritului} = - 3,43 \times \text{descreșterea concentrației de nitrat} \quad (6)$$

astfel încât:

$$\text{Consumul de O}_2 \text{ datorat nitrificării} = \pm 3,43 \times \text{modificarea concentrației de nitrit} + 4,57 \times \text{creșterea concentrației de nitrat} \quad (7)$$

și astfel

$$\text{Consumul de O}_2 \text{ datorat oxidării carbonului} = \text{consumul total observat} - \text{consumul datorită nitrificării} \quad (8)$$

Ca alternativă, dacă se determină numai azotul total oxidat, consumul de oxigen datorat nitrificării poate fi considerat, ca primă aproximație, ca fiind de  $4,57 \times$  creșterea azotului oxidat.

Valoarea corectată a consumului de oxigen datorat oxidării carbonului este apoi comparată cu  $\text{CTO}_{\text{NH}_3}$ , conform calculelor din apendicele 2.



## C.5. DEGRADAREA – CONSUMUL BIOCHIMIC DE OXIGEN

### 1. METODĂ

#### 1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este determinarea consumului biochimic de oxigen (CBO) al substanțelor organice solide sau lichide.

Prin această metodă se pot testa compuși solubili în apă; se pot testa totuși, cel puțin în principiu, și compușii volatili și cei puțin solubili în apă.

Metoda este aplicabilă numai acelor compuși organici care nu sunt inhibitori pentru bacterii la concentrația folosită în test. În cazul în care compusul testat nu este solubil la concentrația testată, se pot folosi măsuri speciale, precum utilizarea dispersiei ultrasonice, pentru a obține o dispersie bună a compusului de testat.

Informațiile despre toxicitatea substanței chimice pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru selectarea unor concentrații adecvate la test.

#### 1.2. DEFINIȚIE ȘI UNITĂȚI

CBO este cantitatea de oxigen dizolvat necesară pentru un volum specificat de soluție a substanței supusă procesului de oxidare biochimică în condiții definite.

Rezultatele se exprimă în grame de CBO pe gram de substanță.

#### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Se recomandă folosirea unei substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea inoculului.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

O cantitate predeterminată de substanță, dizolvată sau dispersată într-un mediu adecvat bine aerat, este inoculată cu microorganisme și incubată la o temperatură constantă, definită, la întuneric.

CBO se determină prin diferența dintre concentrațiile de oxigen dizolvat la începutul și la sfârșitul testului. Durata testului este de minimum 5 zile și maximum 28 de zile.

Într-o testare paralelă se determină CBO pe o probă martor, care nu conține substanță de testat.

#### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Determinarea CBO nu poate fi considerată ca o determinare valabilă a biodegradabilității unei substanțe. Acest test este considerat doar test de triere.

#### 1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se prepară o soluție sau dispersie preliminară de substanță pentru a obține concentrația CBO compatibilă cu metoda folosită. Apoi, se determină CBO conform oricărei metode naționale sau internaționale standardizate.

**▼B****2. DATE ȘI EVALUARE**

CBO conținut în soluția preliminară se calculează conform metodei standardizate alese și se transformă în grame de CBO pe gram de substanță testată.

**3. RAPORT**

Trebuie consemnată metoda folosită.

Consumul biochimic de oxigen trebuie să fie o medie a cel puțin trei măsurători valabile.

Toate informațiile și observațiile importante pentru interpretarea rezultatelor trebuie consemnate, în special cu privire la impurități, starea fizică, efectele toxice și compoziția intrinsecă a substanței care ar afecta rezultatele.

Folosirea unui aditiv pentru inhibiția nitrificării biologice trebuie consemnată.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Listă de metode standardizate, de exemplu:

NF T 90 -103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.



## C.6. DEGRADAREA – CONSUMUL CHIMIC DE OXIGEN

### 1. METODĂ

#### 1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este determinarea consumului chimic de oxigen (CCO) al substanțelor organice solide sau lichide prin aplicarea oricărei metode standardizate, în condiții de laborator stabilite.

Informațiile privind formula substanței sunt utile în realizarea acestui test și pentru interpretarea rezultatului obținut (de exemplu, halogenuri, săruri feroase ale compușilor organici, compuși organici clorurați).

#### 1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Consumul chimic de oxigen este o măsură a oxidabilității unei substanțe, exprimat prin cantitatea echivalentă de oxigen a unui reactiv oxidant consumat de substanță în condiții de laborator stabilite.

Rezultatul se exprimă în grame de CCO pe gram de substanță.

#### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o substanță nouă. Aceste substanțe se folosesc în primul rând pentru a calibra periodic metoda și pentru compararea rezultatelor atunci când se aplică altă metodă.

#### 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

O cantitate predeterminată de substanță, dizolvată sau dispersată în apă, se oxidează cu dicromat de potasiu, în prezența unui catalizator de argint (sulfat de argint) în mediu de acid sulfuric concentrat, cu reflux, timp de două ore. Dicromatul rezidual se determină prin titrare cu sulfat de amoniu și fier.

În cazul substanțelor care conțin clor se adaugă sulfat de mercur<sup>(1)</sup> pentru a reduce interferența acestuia.

#### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Datorită modului arbitrar de determinare, CCO este un „indicator de oxidabilitate” și se folosește ca atare ca metodă practică pentru determinarea conținutului de substanță organică.

Clorurile pot interfera în acest test; agenții anorganici reducători sau oxidanți pot de asemenea să interfereze la determinarea CCO.

Unii compuși ciclici și multe substanțe volatile (de exemplu, acizi grași inferiori) nu sunt oxidați complet în acest test.

#### 1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se prepară o soluție sau dispersie preliminară de substanță pentru a obține CCO între 250 și 600 mg/l.

<sup>(1)</sup> După folosire, soluțiile conținând săruri de mercur trebuie tratate pentru a evita pătrunderea mercurului în mediul înconjurător.

**▼B***Observații:*

În cazul substanțelor puțin solubile și nedispersabile se poate cântări o cantitate de substanță fin pulverizată sau lichidă, corespunzând la aproximativ 5 mg CCO, care se introduce în aparatul experimental cu apă.

CCO se determină mai ușor, deseori și în special în cazul substanțelor puțin solubile, printr-o variantă a metodei, în sistem închis cu egalizator de presiune (H. Kelkenberg, 1975). Prin această variantă a metodei, compușii care sunt determinați cu dificultate prin metoda convențională – de exemplu acid acetic – pot fi adesea determinați cu succes. Metoda nu dă rezultate bune, însă, în cazul piridinei. Dacă, în conformitate cu referința bibliografică 1, concentrația de dicromat de potasiu crește la 0,25 N (0,0416 M), devine mai ușoară cântărirea directă a 5-10 mg de substanță, ceea ce este esențial pentru determinarea CCO la substanțele puțin solubile în apă (referința 2).

În alte cazuri, CCO se determină apoi după orice metodă adecvată națională sau internațională standardizată.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

CCO conținut în vasul experimental se calculează după metoda standardizată aleasă și se convertește în grame de CCO pe gram de substanță.

3. **RAPORT**

Se consemnează metoda de referință folosită.

Consumul chimic de oxigen trebuie să fie media a cel puțin 3 măsurători. Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cu privire la impurități, starea fizică, proprietățile intrinseci ale substanței (dacă se cunosc) care ar putea afecta rezultatele.

Trebuie consemnată utilizarea sulfatului de mercur pentru a reduce la minim interferența clorurilor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, p. 146.
2. Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, p. 169.

Lista metodelor standardizate, de exemplu:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

**▼B****C.7. DEGRADAREA – DEGRADAREA ABIOTICĂ: HIDROLIZA  
CA O FUNCȚIE A PH-ULUI****1. METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 111 (2004) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Substanțele chimice pot pătrunde în apele de suprafață prin următoarele căi: direct, prin pulverizare, prin spălare, prin sistemul de canalizare, prin depozitarea deșeurilor, prin deversări industriale, casnice sau agricole și prin depuneri din atmosferă. În apă, substanțele suferă procese chimice (de exemplu hidrolizare sau oxidare), procese fotochimice și/sau procese microbiologice de transformare. Această Orientare, bazată pe Orientările menționate la referințele 1, 2, 3, 4, 5, 6 și 7 existente, descrie o metodă de laborator prin care se evaluează transformarea prin hidroliză abiotică a substanțelor chimice în sistemele apoase, la o valoare a pH-ului găsită în mod normal în mediul înconjurător (pH = 4-9).

Experimentele sunt realizate pentru a determina (i) rata hidrolizării substanței test ca funcție a pH-ului și (ii) felul sau natura și ratele de formare și epurare a produșilor de hidroliză la care poate fi expus organismul. Asemenea studii pot fi necesare pentru substanțele chimice care pătrund în apă direct, sau care ajung în mediul înconjurător prin metodele descrise mai sus.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

A se vedea appendicele 2.

**1.3. APLICABILITATEA METODEI**

Această metodă este aplicabilă în general substanțelor chimice (marcate sau nu) pentru care este disponibilă o metodă analitică suficient de sensibilă și sigură. Este aplicabilă pentru compuși slab volatili sau nevolatili și care sunt suficient de solubili în apă. Testul nu trebuie aplicat substanțelor chimice puternic volatile din apă (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care, din această cauză, nu pot fi menținuți în soluție, în condițiile experimentale ale acestui test. Pentru substanțele cu solubilitate mică în apă, testul este dificil de realizat (8).

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Soluțiile apoase tampon sterile, cu valori diferite ale pH-ului (pH de 4, 7 și 9), sunt tratate cu substanța testată și incubate la întuneric, în condiții controlate de laborator (la temperatură constantă). După un interval adecvat de timp, soluțiile tampon sunt analizate atât pentru substanța testată, cât și pentru produșii de hidroliză. În cazul substanțelor de testare marcate (de exemplu cu  $^{14}\text{C}$ ), bilanțul maselor poate să fie calculat mai ușor.

Această metodă de testare este realizată secvențial, așa cum este arătat și explicat în appendicele 1. Fiecare secvență este declanșată de rezultatul celei anterioare.

**▼B****1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE**

Rata de hidroliză poate fi măsurată cu ajutorul substanțelor marcate sau nemarcate. Deși pentru studierea procesului de hidroliză și pentru stabilirea bilanțului maselor, este preferat în general materialul marcat, totuși, în unele cazuri, acesta nu este absolut necesar. Este recomandată marcarea cu  $^{14}\text{C}$ , însă este la fel de utilă și folosirea altor izotopi, cum ar fi  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ . Pe cât posibil, marcarea ar trebui făcută în porțiunea (porțiunile) cea mai stabilă a moleculei. De exemplu, dacă substanța testată are în structură un inel, este necesar ca marcarea să se facă la acest nivel. Dacă substanța testată conține două sau mai multe inele, sunt necesare studii separate pentru a evalua rezultatul marcării fiecărui inel în parte și pentru a obține informații adecvate despre formarea produșilor de hidroliză. Puriitatea substanței testate trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înainte de desfășurării unui test de hidroliză, trebuie să fie disponibile următoarele informații despre substanța testată:

- (a) solubilitatea în apă [Metoda de testare A.6];
- (b) solubilitatea în solvenți organici;
- (c) presiunea vaporilor [Metoda de Testare A.4] și/sau constanta lui Henry;
- (d) coeficientul de partiție n-octanol/apă [Metoda de testare A.8];
- (e) constanta de disociere (pKa) (Orientarea 112 a OCDE) (9);
- (f) rata de fototransformare directă sau indirectă în apă, acolo unde este cazul.

Trebuie să fie disponibile metode analitice de cuantificare ale substanței testate și, dacă este relevant, metode de identificare și cuantificare ale produșilor de hidroliză în soluții apoase (a se vedea, de asemenea, punctul 1.7.2).

**1.6. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

Atunci când este posibil, substanțele de referință ar trebui utilizate pentru identificarea și cuantificarea produșilor de hidroliză prin metode spectroscopice, cromatografice sau prin alte metode sensibile adecvate.

**1.7. CRITERII DE CALITATE****1.7.1. Randamentul de recuperare**

Analizarea cel puțin a substanțelor tampon duplicate sau a produșilor lor de reacție rezultați imediat după adăugarea substanței testate oferă o primă concluzie asupra repetabilității metodei analitice și asupra uniformității procedurii pentru substanța experimentală. Randamentul de recuperare pentru stadiile mai avansate ale experimentelor este indicat de bilanțul maselor respectiv (când sunt folosite substanțe marcate). Pentru substanțele chimice marcate și nemarcate, randamentele de recuperare trebuie să aibă valori cuprinse între 90 % și 110 %. În cazul existenței dificultăților tehnice pentru atingerea acestor valori, un randament de 70 % este acceptat pentru substanțele chimice nemarcate, dar ar trebui oferite explicații suplimentare.



**▼B****1.7.2. Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei/metodelor analitice folosite pentru măsurarea în stadii avansate a substanței de testat și a produșilor de hidroliză poate fi verificată prin repetarea analizei aceleiași substanțe tampon (sau a produșilor ei de reacție), după ce s-a format o cantitate suficientă de produși de hidroliză pentru a putea fi măsurată.

Metoda analitică trebuie să fie suficient de sensibilă pentru cuantificarea substanței test la o concentrație de 10 % sau mai puțin din concentrația inițială. În anumite cazuri, metodele analitice ar trebui să fie suficient de sensibile pentru a măsura produșii de hidroliză reprezentând 10 % sau mai mult din substanța inițială (în orice moment al studiului) și până la 25 % sau mai puțin din concentrația maximă.

**1.7.3. Intervalele de încredere pentru cinetica hidrolizei**

Pentru toți coeficienții de regresie, constantele vitezei de reacție, timpii de înjumătățire și oricare alți parametri de cinetică (de exemplu  $DT_{50}$ ) trebuie calculate și prezentate intervalele de încredere.

**1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.8.1. Aparatură și echipament**

Experimentul trebuie desfășurat în recipiente de sticlă (de exemplu tuburi de test, retorte mici) în condiții sterile, la întuneric dacă este necesar, cu excepția cazurilor în care informațiile preliminare (de exemplu coeficientul de partiție n-octanol/apă) au indicat că substanța testată este aderentă de sticlă. În asemenea cazuri, trebuie luate în considerare materialele alternative (cum ar fi teflonul). Problema aderenței la sticlă poate fi evitată și prin folosirea uneia sau mai multora dintre următoarele metode:

- determinarea masei substanței de testat și produșii de hidroliză absorbiți de recipientul testat;
- folosirea unei băi ultrasonice;
- asigurarea unei spălări pe bază de solvent a recipientelor de sticlă la fiecare interval de colectare a datelor;
- utilizarea produselor preparate;
- folosirea unei cantități crescute de cosolvent pentru adăugarea substanței de testat; dacă se folosește un cosolvent, acesta nu trebuie să hidrolizeze substanța de testat.

În mod normal, sunt necesare băi de apă termostatare cu sistem de vibrație sau incubatoare termostatare pentru incubarea diferitelor substanțe de testat.

Este necesară folosirea unui echipament de laborator standard, care să cuprindă în special următoarele:

- pH-metru;

**▼B**

- instrumente analitice cum ar fi echipament GC, HPLC, TLC, inclusiv sisteme adecvate de detectare pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a celor nemarcate sau a metodei de diluare izotopică inversă;
- instrumente folosite în scopul identificării (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR etc.);
- contor de scintilație lichidă;
- pâlnii separatoare pentru extracția lichid-lichid;
- instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a produșilor de reacție (de exemplu evaporator rotativ);
- dispozitiv de control al temperaturii (de exemplu baie de apă).

Reactanții chimici cuprind, de exemplu:

- solvenți organici, puri din punct de vedere chimic, cum ar fi hexanul, diclormetanul etc.;
- lichid de scintilație;
- soluție tampon (pentru detalii a se vedea punctul 1.8.3).

Toate recipientele din sticlă, apa pură și soluțiile tampon folosite în testele de hidroliză trebuie să fie sterilizate.

#### 1.8.2. **Utilizarea substanței de testare**

Substanțele de testare trebuie folosite ca soluții apoase în diferite soluții tampon (a se vedea apendicele 3). Dacă este necesar pentru dizolvarea adecvată, este permisă folosirea unor cantități mici de solvenți care pot fi amestecați cu apa (cum sunt acetonitrilul, acetona, etanolul) în vederea aplicării și distribuției substanței testate, dar în mod normal nu ar trebui să se depășească 1 % v/v. Folosirea unei concentrații mai mari de solvent (de exemplu în cazul substanțelor de testare cu solubilitate mică în apă) nu este permisă decât atunci când se demonstrează că solventul nu are efect asupra hidrolizei substanței de testare.

Utilizarea unui produs preparat nu este recomandată în mod curent, deoarece nu se poate exclude că ingredientele de preparare pot influența procesul de hidroliză. Totuși, pentru substanțele de testare cu solubilitate mică în apă sau pentru substanțele aderente de sticlă (a se vedea punctul 1.8.1), folosirea substanțelor preparate constituie o alternativă adecvată.

Trebuie folosită o singură concentrație a substanței de testare; aceasta nu trebuie să depășească 0,01 M sau jumătate din concentrația de saturare (a se vedea apendicele 1).

**▼B****1.8.3 Soluții tampon**

Testul de hidroliză trebuie realizat la valori ale pH-ului de 4, 7 și 9. În acest scop, soluțiile tampon trebuie preparate folosind apă și substanțe chimice purificate. În apendicele 3 sunt prezentate câteva sisteme tampon folosite. Trebuie avut în vedere că sistemele tampon pot influența rata de hidroliză; când acest lucru este observat trebuie folosit un alt sistem tampon <sup>(1)</sup>.

pH-ul fiecărei soluții tampon trebuie să corespundă, cu o precizie de cel puțin 0,1, cu valoarea pH-ului măsurată de un pH-metru calibrat la temperatura cerută.

**1.8.4 Condiții de testare****1.8.4.1 Temperatura de testare**

Reacțiile de hidroliză din experiment trebuie efectuate la o temperatură constantă. În vederea extrapolării, este important ca temperatura să fie menținută la cel puțin  $\pm 0,5$  °C.

Dacă nu se cunoaște comportamentul hidrolitic al substanței test, trebuie efectuat un test preliminar (faza 1) la o temperatură de 50 °C. Testele cinetice de fază mai avansată ar trebui realizate la un minimum de trei temperaturi (incluzând testul la 50 °C), cu excepția cazului în care substanța este stabilă la hidroliză, așa cum s-a demonstrat în faza 1 a testului. Intervalul de temperatură sugerat este cuprins între 10 și 70 °C (preferabil cu utilizarea a cel puțin unei temperaturi sub 25 °C), care va include și temperatura raportată de 25 °C și cele mai multe dintre temperaturile întâlnite.

**1.8.4.2 Lumina și oxigenul**

Toate testele de hidroliză se vor desfășura prin folosirea unor metode adecvate care evită efectul fotolitic. Vor fi luate toate măsurile pentru evitarea oxigenului (de exemplu prin barbotarea heliului, a nitrogenului sau a argonului timp de 5 minute înaintea pregătirii soluției).

**1.8.4.3 Durata testului**

Testul preliminar trebuie să dureze 5 zile, în timp ce fazele mai avansate trebuie să se desfășoare fie până când hidroliza substanței test s-a produs în proporție de 90 %, fie timp de 30 de zile, în funcție de care din evenimente se produce primul.

**1.8.5 Realizarea testului****1.8.5.1 Testul preliminar (faza 1)**

Testul preliminar trebuie realizat la o temperatură de  $50 \pm 0,5$  °C și la un pH de 4, 7 și 9. Dacă după 5 zile hidroliza s-a produs într-un procent mai mic de 10 % ( $t_{0,5}$  la 25 °C > 1 an), substanța testată este considerată stabilă la hidroliză și nu mai este necesar niciun test suplimentar. Dacă se cunoaște că substanța este instabilă la temperatura mediului înconjurător <sup>(2)</sup>, testul preliminar nu mai este necesar. Metoda analitică trebuie să fie suficient de precisă și sensibilă pentru a detecta reducerea cu 10 procente din concentrația inițială.

<sup>(1)</sup> Mabey și Mill recomandă folosirea boratului și acetatului în locul fosfatului (11).

<sup>(2)</sup> Astfel de informații pot veni din alte surse, precum informațiile despre hidroliza unor compuși cu structură similară, din literatură sau din alte teste de hidroliză semicantitativă cu substanțele experimentale într-un stadiu incipient de dezvoltare.

**▼B****1.8.5.2. Hidroliza substanțelor instabile (faza 2)**

Fazele avansate ale testului trebuie să fie realizate la valori ale pH-ului la care substanțele test au fost găsite instabile, după cum s-a arătat în testul preliminar de mai sus. Soluțiile tampon ale substanței de testat trebuie să fie incubate la temperaturile selectate. Pentru a testa comportamentul primar, fiecare soluție din reacție trebuie să fie analizată în intervalele de timp care asigură un minimum de șase puncte de reper normale separate ale hidrolizării între 10 % și 90 % ale substanței de testat. Replicarea fiecărei probe a testului (minimum dublarea probelor conținute în vase separate de reacție) trebuie înlăturată, iar conținutul trebuie analizat la fiecare din cel puțin șase momente de eșantionare (pentru un minimum de douăsprezece puncte de reper replicate). Utilizarea unui singur eșantion de mărime de la care s-au îndepărtat părțile alicote ale soluțiilor experimentale la fiecare moment de eșantionare, este considerată neadecvată deoarece, în acest fel nu este permisă analizarea variabilității datelor și se poate ajunge la probleme de contaminare a soluțiilor testate. La finalul fazei avansate a testului (adică la hidrolizarea în procent de 90 % sau după 30 de zile) trebuie efectuate teste de confirmare a sterilității. Totuși, testele de sterilitate nu sunt necesare dacă nu s-a observat nicio degradare (adică transformare).

**1.8.5.3. Identificarea produșilor de hidroliză (faza 3)**

Orice produși majori de hidroliză, cel puțin cei care reprezintă > 10 % din doza inițială, trebuie identificați prin metode analitice adecvate.

**1.8.5.4. Teste opționale**

Pentru substanțele test instabile la hidroliză pot fi necesare teste suplimentare la alte valori ale pH-ului decât 4, 7 și 9. De exemplu, în scopuri fiziologice, un test în condiții mai acide (de exemplu pH de 1,2) poate fi necesar prin înlocuirea unei singure temperaturi relevante fiziologic (37 °C).

**2. DATE**

Cantitățile de substanță test și de produși de hidroliză trebuie date ca procente din substanța folosită inițial, iar acolo unde este cazul, ca mg/L pentru fiecare interval de eșantionare și pentru fiecare pH și temperatură din test. În plus, bilanțul maselor trebuie calculat ca procent din concentrația inițială, atunci când s-au folosit substanțe test marcate.

Trebuie realizată reprezentarea grafică a transformării logaritmice a concentrației substanței test în funcție de timp. Trebuie identificați orice produși majori de hidroliză, cel puțin cei care reprezintă > 10 % din doza inițială, iar transformarea logaritmică a concentrației lor trebuie reprezentată în aceeași manieră ca pentru substanța inițială, pentru a arăta ratele de formare și de declin.

**▼B****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se pot obține determinări mai precise ale timpilor de înjumătățire sau ale  $DT_{50}$  prin folosirea unor modele cinetice adecvate. Timpii de înjumătățire și/sau valoarea  $DT_{50}$  (inclusiv marjele de eroare) trebuie raportate pentru fiecare valoare a pH-ului sau a temperaturii, împreună cu descrierea modelului folosit, ordinul cinetic și coeficientul de determinare ( $r^2$ ). Acolo unde este cazul, aceste calcule trebuie să fie aplicate și asupra produșilor de hidroliză.

În cazul studierii vitezei de reacție desfășurate la temperaturi diferite, constantele vitezei de reacție ( $k_{\text{obs}}$ ) ale hidrolizei cu cinetică de pseudo ordin I trebuie descrise în funcție de temperatură. Calculele trebuie să se bazeze atât pe separarea  $k_{\text{obs}}$  în constante ale vitezelor de reacție pentru hidroliza catalizată în mediu acid, neutru sau bazic ( $k_{\text{H}}$ ,  $k_{\text{neutru}}$  și, respectiv  $k_{\text{OH}}$ ), cât și pe ecuația Arrhenius:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{neutru}} + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = \sum_{i = \text{H, neutru, OH}} A_i e^{-B_i/T}$$

unde  $A_i$  și  $B_i$  sunt constantele de regresie pentru segment și respectiv pantă, ale liniilor de optimă ajustare, generate din regresia lineară  $\ln k_i$  reprezentată în funcție de inversul temperaturii absolute în grade Kelvin (T) Prin folosirea ecuației Arrhenius pentru hidroliza catalizată în mediu acid, neutru sau bazic, se pot calcula constantele vitezei de reacție cu cinetică de pseudo ordin I, și astfel timpii de înjumătățire pentru alte temperaturi, pentru care determinarea directă a constantei vitezei de reacție nu este posibilă (10).

**2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Majoritatea reacțiilor de hidroliză sunt aparent reacții de ordinul I și, de aceea, timpii de înjumătățire sunt independenți de concentrație (a se vedea ecuația 4 din apendicele 2) Acest lucru permite de obicei aplicarea rezultatelor de laborator, determinate de la  $10^{-2}$  la  $10^{-3}$  M, în condițiile mediului înconjurător ( $\leq 10^{-6}$  M) (10). Mabey și Mill au raportat câteva exemple de corespondență între vitezele de hidroliză atât în apă pură, cât și în apă naturală, pentru o varietate de substanțe chimice, cu condiția ca pH-ul și temperatura să fi fost măsurate.

**3. RAPORT****3.1. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța de testare:

— numele obișnuit, numele chimic, numărul CAS, structura chimică (indicându-se poziția în care a fost marcată, atunci când se folosesc substanțe marcate radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea punctul 1.5);

— puritatea (impuritățile) substanței experimentale;

— puritatea substanței de marcare pentru substanțele chimice marcate și activitatea molară (acolo unde este cazul).

**▼B**

- Soluțiile tampon:
- date și detalii despre preparare;
- soluțiile tampon și soluțiile apoase folosite;
- molaritatea și pH-ul soluțiilor tampon.

## Condițiile de testare:

- date despre desfășurarea experimentelor;
- cantitatea de substanță de testare folosită;
- metodă și solvenți (tip și cantitate) folosiți pentru aplicarea substanței de testare;
- volumul soluțiilor tampon ale substanței de testare incubate;
- descrierea sistemelor de incubare folosite;
- pH-ul și temperatura în timpul experimentului;
- intervalele de eșantionare;
- metoda (metodele) de extracție;
- metode de cuantificare și identificare ale substanței de testare și ale produșilor de hidroliză în soluțiile tampon;
- număr de repetări.

## Rezultate:

- repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice folosite;
- randamentele de recuperare (valorile procentuale pentru un experiment valabil sunt date în punctul 1.7.1);
- replicarea datelor și mijloacelor sub formă de tabel;
- bilanțul maselor în timpul și la sfârșitul experimentelor (când se folosesc substanțe test marcate);
- rezultatele testului preliminar;
- discuții și interpretarea rezultatelor;
- toate datele și cifrele originale.

Următoarele date sunt necesare doar în cazul în care viteza reacției de hidroliză este determinată:

- graficele concentrațiilor în funcție de timp pentru substanța de testare și, acolo unde este cazul, pentru produșii de hidroliză la fiecare valoare a pH-ului și a temperaturii;
- tabele cu rezultatele ecuației Arrhenius pentru temperaturi de 20 °C/25 °C, cu pH, constanta vitezei de reacție [ $\text{ora}^{-1}$  sau  $\text{ziua}^{-1}$ ], timpii de înjumătățire sau  $DT_{50}$ , temperaturi [°C], inclusiv intervalele de încredere și coeficienții de corelație ( $r^2$ ) sau informații similare;
- calea de hidroliză propusă.

**▼B**

4.

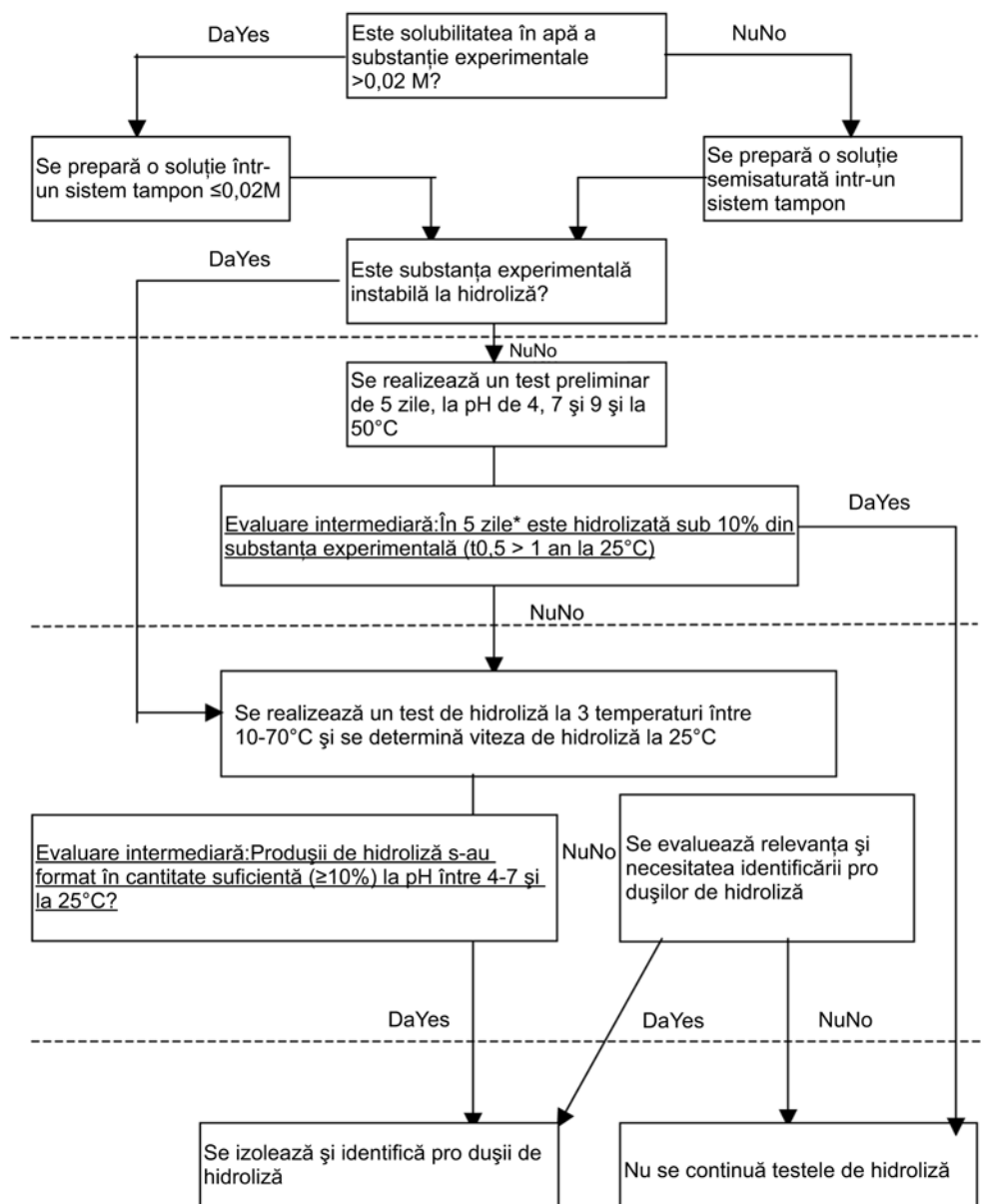
**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD (1981), Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.
2. US-Environmental Protection Agency (1982), 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
3. Agriculture Canada (1987), Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
4. Uniunea Europeană (UE) (1995), Directiva 95/36/CE a Comisiei din 14 iulie 1995 de modificare a Directivei 91/414/CEE a Consiliului privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare. Apendicele V: Comportamentul în mediu.
5. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991), Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
6. BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
7. SETAC (1995), Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
8. OECD (2000), Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.
9. OECD (1993), Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997), Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
11. Mabey, W. and Mill, T. (1978), Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼ B

## Apendicele 1

## Schema secvențelor testului de hidroliză



\* hidroliza a 10% din substanța experimentală la 50°C corespunde unui timp de înjumătățire de aprox. 30 zile, care corespunde unei valori de aprox. 1 an la 25°C.



**▼ B***Apendicele 2***Definiții și unități**

**Unitățile internaționale standard (SI)** trebuie folosite în toate cazurile.

**Substanța experimentală:** orice substanță, fie compusul inițial, fie produșii de transformare relevanți.

**Produși de transformare:** toate substanțele care rezultă din reacțiile de transformare biotică sau abiotică a substanței experimentale.

**Produși de hidroliză:** toate substanțele care rezultă din reacțiile de hidroliză ale substanței experimentale.

**Hidroliza** se referă la reacția unei substanțe experimentale RX cu apa, cu schimbarea grupului X cu OH în timpul reacției:



Viteza cu care scade concentrația substanței RX în acest proces simplificat este dată de

$$\text{viteza} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad \text{reacție de ordin doi}$$

sau

$$\text{viteza} = k [\text{RX}] \quad \text{reacție de ordinul întâi}$$

depinzând de viteza pasului determinant. Deoarece apa este prezentă în exces comparativ cu substanța test, acest tip de reacție este descrisă de obicei ca reacție de pseudo ordin întâi, în care constanta observată a vitezei de reacție este dată de relația

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

și poate fi determinată din formula (\*)

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

unde:

t = timp

și  $C_0$ ,  $C_t$  = concentrațiile RX la momentul 0 și t.

Unitățile de măsură ale acestei constante au dimensiunea  $(\text{timp})^{-1}$ , iar timpul de înjumătățire al reacției (timpul necesar pentru ca 50 % din substanța RX să reacționeze) este dat de

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

**Timpul de înjumătățire:** ( $t_{0,5}$ ) este timpul necesar pentru hidroliza a 50 % din substanța test când reacția poate fi descrisă ca reacție cu cinetică de ordin întâi; este dependent de concentrație.

(\*) Dacă graficul transformării logaritmice în funcție de timp nu arată o funcție liniară (egalată de o viteză de reacție de ordin întâi), atunci folosirea ecuației [3] nu este adecvată pentru determinarea constantelor vitezelor de reacție ale compușilor experimentali.

**▼B**

**DT<sub>50</sub> (timp de dispariție 50)** este timpul în care concentrația substanței experimentale este redusă cu 50 %; este diferit de timpul de înjumătățire  $t_{0,5}$  atunci când reacția nu se supune unei cinetici de ordinul întâi.

**Determinarea constantei k la diferite temperaturi**

Atunci când se cunosc constantele vitezei de reacție pentru două temperaturi, constantele pentru alte temperaturi se pot calcula folosind ecuația Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ sau } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graficul  $\ln k$  în funcție de  $1/T$  este o dreaptă având panta de  $-E/R$

unde:

$k$  = constanta vitezei de reacție măsurată la diferite temperaturi

$E$  = energia de activare [kJ/mol]

$T$  = temperatura absolută [K]

$R$  = constanta gazului [8,314 J/mol.K]

Energia de activare este calculată prin analiza regresiei sau prin următoarea ecuație:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

unde:  $T_2 > T_1$ .

## ▼B

## Apendicele 3

## Sisteme tampon

## A. CLARK ȘI LUBS:

## Amestecuri tampon tip CLARK și LUBS (\*)

| Compoziție  | pH  |
|---|-----|
| <b>HCl 0,2 N și KCl 0,2 N la 20 °C</b>                  |     |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml             | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml            | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml            | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml            | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml              | 1,8 |
| 5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml              | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml             | 2,2 |
| <b>Biftalat monopotasice 0,1 M + HCl 0,1 N la 20 °C</b> |     |
| 46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 2,2 |
| 39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 2,4 |
| 32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 2,6 |
| 26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 2,8 |
| 20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 3,0 |
| 14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 3,2 |
| 9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml       | 3,4 |
| 5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml       | 3,6 |
| 2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml       | 3,8 |
| <b>Biftalat potasice 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C</b>    |     |
| 0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 4,0 |
| 3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 4,2 |
| 7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml      | 4,4 |
| 12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml     | 4,6 |
| 17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml     | 4,8 |

(\*) Valorile pH-ului din aceste tabele au fost calculate pornind de la măsurătorile potențiale folosind ecuația Sørensen standard (1909). Valorile care corespund pH-ului sunt cu 0,04 unități mai mari decât valorile din tabel.

**▼B**

| Compoziție  | pH  |
|---|-----|
| 23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml | 6,0 |

**Amestecuri tampon tip CLARK și LUBS (Continuare)**

| <b>Fosfat monopotasic 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C</b>                       |     |
|---|-----|
| 5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                            | 6,0 |
| 8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                            | 6,2 |
| 12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 6,4 |
| 17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 6,6 |
| 23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 6,8 |
| 29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 7,0 |
| 35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 7,2 |
| 39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 7,4 |
| 42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 7,6 |
| 45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 7,8 |
| 46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml                           | 8,0 |
| <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,1 M în KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C</b> |     |
| 2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                        | 7,8 |
| 3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                        | 8,0 |
| 5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                        | 8,2 |
| 8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                        | 8,4 |
| 12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                       | 8,6 |
| 16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                       | 8,8 |
| 21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                       | 9,0 |
| 26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml                       | 9,2 |

**▼B**

|   |      |
|---|------|
| 32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml | 9,4  |
| 36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml | 9,6  |
| 40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml | 9,8  |
| 43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml | 10,0 |

**B. KOLTHOFF ȘI VLEESCHHOUWER:****Sisteme tampon citrat tip KOLTHOFF și VLEESCHHOUWER**

| Compoziție  | pH  |
|---|-----|
| <b>Citrat monopotasice 0,1 M și HCl 0,1 N la 18 °C (*)</b>  |     |
| 49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 2,2 |
| 43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 2,4 |
| 36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 2,6 |
| 30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 2,8 |
| 23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 3,0 |
| 17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 3,2 |
| 10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 3,4 |
| 4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml              | 3,6 |
| <b>Citrat monopotasice 0,1 M și NaOH 0,1 N la 18 °C (*)</b> |     |
| 2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 3,8 |
| 9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml             | 4,0 |
| 16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 4,2 |
| 23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 4,4 |
| 31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 4,6 |
| 39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 4,8 |
| 46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 5,0 |
| 54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 5,2 |
| 61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 5,4 |
| 68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 5,6 |
| 74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 5,8 |
| 81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml            | 6,0 |

(\*) Se adaugă cristale mici de timol sau substanțe asemănătoare pentru a preveni creșterea mușcărilor.

**▼B****C. SÖRENSEN:****Amestecuri borate tip SÖRENSEN**

| Compoziție                |             | Sörensen<br>18 °C | Walbum, pH la |       |       |
|---------------------------|-------------|-------------------|---------------|-------|-------|
| ml Borax                  | ml HCl/NaOH |                   | 10 °C         | 40 °C | 70 °C |
| borax 0,05 M + HCl 0,1 N  |             |                   |               |       |       |
| 5,25                      | 4,75        | 7,62              | 7,64          | 7,55  | 7,47  |
| 5,50                      | 4,50        | 7,94              | 7,98          | 7,86  | 7,76  |
| 5,75                      | 4,25        | 8,14              | 8,17          | 8,06  | 7,95  |
| 6,00                      | 4,00        | 8,29              | 8,32          | 8,19  | 8,08  |
| 6,50                      | 3,50        | 8,51              | 8,54          | 8,40  | 8,28  |
| 7,00                      | 3,00        | 8,08              | 8,72          | 8,56  | 8,40  |
| 7,50                      | 2,50        | 8,80              | 8,84          | 8,67  | 8,50  |
| 8,00                      | 2,00        | 8,91              | 8,96          | 8,77  | 8,59  |
| 8,50                      | 1,50        | 9,01              | 9,06          | 8,86  | 8,67  |
| 9,00                      | 1,00        | 9,09              | 9,14          | 8,94  | 8,74  |
| 9,50                      | 0,50        | 9,17              | 9,22          | 9,01  | 8,80  |
| 10,00                     | 0,00        | 9,24              | 9,30          | 9,08  | 8,86  |
| borax 0,05 M + NaOH 0,1 N |             |                   |               |       |       |
| 10,0                      | 0,0         | 9,24              | 9,30          | 9,08  | 8,86  |
| 9,0                       | 1,0         | 9,36              | 9,42          | 9,18  | 8,94  |
| 8,0                       | 2,0         | 9,50              | 9,57          | 9,30  | 9,02  |
| 7,0                       | 3,0         | 9,68              | 9,76          | 9,44  | 9,12  |
| 6,0                       | 4,0         | 9,97              | 10,06         | 9,67  | 9,28  |

**Amestecuri fosfate tip SÖRENSEN**

| Compoziție  | pH  |
|---|-----|
| <b>Fosfat monopotasie 0,0667 M + Fosfat disodic 0,0667 M la 20 °C</b> |     |
| 99,2 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 0,8 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   | 5,0 |
| 98,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 1,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   | 5,2 |
| 97,3 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 2,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   | 5,4 |
| 95,5 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 4,5 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   | 5,6 |
| 92,8 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 7,2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   | 5,8 |
| 88,9 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 11,1 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 6,0 |
| 83,0 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 17,0 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 6,2 |
| 75,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 24,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 6,4 |
| 65,3 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 34,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 6,6 |

**▼B**

|  |     |
|--|-----|
| 53,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 46,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 6,8 |
| 41,3 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 58,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 7,0 |
| 29,6 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 70,4 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 7,2 |
| 19,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 80,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 7,4 |
| 12,8 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 87,2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 7,6 |
| 7,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 92,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 7,8 |
| 3,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 96,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  | 8,0 |



## C.8. TOXICITATEA LA RÂME

### TEST PE SOL ARTIFICIAL

#### 1. METODĂ

##### 1.1. INTRODUCERE

În acest test de laborator substanța de testat se adaugă la un sol artificial în care se plasează râme timp de 14 zile. După această perioadă (și opțional după 7 zile) se examinează efectul letal al substanței pe râme. Testul reprezintă o metodă pentru determinarea pe termen relativ scurt a efectului substanțelor chimice pe râme prin absorbție cutanată și prin ingestie.

##### 1.2. DEFINIȚIE ȘI UNITATE DE MĂSURĂ

CL<sub>50</sub>: concentrația unei substanțe care este statistic responsabilă pe parcursul unei expuneri de moartea a 50 % din animalele expuse pe durata testului.

##### 1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Se folosește periodic o substanță de referință ca modalitate de a demonstra că sensibilitatea sistemului de testare nu s-a schimbat semnificativ.

Se recomandă ca substanță de referință cloracetamida de puritate analitică.

##### 1.4. PRINCIPIUL TESTULUI

Solul fiind un mediu variabil, pentru acest test se folosește un sol artificial de argilă cu caracteristici definite cu atenție. Râmele adulte din specia *Eisenia foetida* (a se vedea nota din apendice) sunt ținute într-un sol artificial, definit, tratat cu diferite concentrații ale substanței de testat. Conținutul recipientelor este așezat pe o tavă după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului și se numără râmele care au supraviețuit fiecărei concentrații.

##### 1.5. CRITERII DE CALITATE

Testul este conceput astfel încât să fie cât se poate de reproductibil cu privire la substratul de testare și organism. Dacă mortalitatea în loturile martor depășește 10 % la sfârșitul testului, acesta este invalidat.

##### 1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

###### 1.6.1. Materiale

###### 1.6.1.1. Substrat de testare

Ca substrat de bază se folosește un sol artificial definit.

(a) Substratul de bază (procente exprimate în greutate uscată):

— 10 % mușchi de turbă (cât se poate de aproape de pH 5,5-6,0 și pe cât posibil fără resturi vizibile de plante și pământ);



**▼B**

- 20 % argilă caolinică, de preferat cu mai mult de 50 % caolinită;
- aproximativ 69 % nisip industrial de cuarț (mai mult de 50 % nisip fin cu dimensiunea particulelor de 0,05-0,2 mm). Dacă substanța nu se dispersează suficient în apă, trebuie păstrată o cantitate de 10 g nisip/recipient de testare pentru amestecare ulterioară cu substanța de testat;
- aproximativ 1 % carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ ) pulbere, chimic pur, adăugat pentru a ajusta pH-ul la  $6,0 \pm 0,5$ .

**(b) Substratul de testare**

Substratul de testare conține substratul de bază, substanța de testat și apă deionizată.

Conținutul de apă este de aproximativ 25-42 % din greutatea uscată a substratului de bază. Conținutul de apă al substratului este determinat aducând la greutate constantă un eșantion, prin uscare la 105 °C. Criteriul cheie este acela că solul artificial trebuie udat așa încât apa să nu ajungă să bâlțească. Amestecarea se face cu grijă pentru a se obține o distribuție uniformă a substanței de testat și a substratului. Modul de introducere a substanței de testat în substrat trebuie trecut în raportul de testare.

**(c) Substratul martor**

Substratul martor conține substratul de bază și apă. Dacă se folosește un aditiv, se adaugă un substrat martor suplimentar care trebuie să conțină aceeași cantitate de aditiv.

**1.6.1.2. Recipiente de testare**

Recipiente de sticlă cu o capacitate de aproximativ 1 l (acoperite adecvat cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic cu perforații de aerisire) umplute cu o cantitate de substrat de testare umed sau substrat martor umed, echivalent cu 500 g de substrat uscat.

**1.6.2. Condiții de testare**

Recipientele trebuie păstrate în incinte climatizate la o temperatură de  $20 \pm 2$  °C cu lumină continuă. Intensitatea luminii trebuie să fie de 400-800 de lux.

Perioada de testare este de 14 zile, dar mortalitatea poate fi evaluată opțional la 7 zile de la începerea testului.

**1.6.3. Mod de operare****Concentrațiile substanței de testat**

Concentrațiile substanței de testat sunt exprimate ca raport între masa substanței și masa substratului de bază uscat (mg/kg).

**Testul preliminar**

Intervalul de concentrații care provoacă mortalități de 0-100 % se poate determina printr-un test preliminar, care să ofere informații despre intervalul de concentrații ce trebuie folosite în testul definitiv.

**▼B**

Substanța trebuie testată la următoarele concentrații: 1 000; 100; 10; 1 și 0,1 mg substanță/kg substrat de testare (greutate uscată).

Dacă urmează să se efectueze un test final, complet, un lot per concentrație și un lot pentru martorul netratat, fiecare cu câte 10 râme, pot fi suficiente pentru testul preliminar.

#### Testul definitiv

Rezultatele testului preliminar se folosesc pentru a selecta cel puțin 5 concentrații într-o serie geometrică din domeniul 0-100 % mortalitate, care diferă cu un raport constant de maximum 1,8.

Testele în care se folosesc aceste serii de concentrații trebuie să permită, cu cea mai mare precizie posibilă, estimarea valorii  $CL_{50}$  și a limitelor de încredere.

În testul definitiv se folosesc 4 loturi de testare per concentrație și 4 loturi martor netratate, fiecare cu 10 râme. Rezultatele acestor loturi replicate se prezintă ca medie, precizându-se deviația standard.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, aceste două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află  $CL_{50}$ .

#### Amestecul de substrat de bază și substanță testată

Dacă este posibil, substratul de testare trebuie preparat fără agenți suplimentari alții decât apa. Imediat înainte de începerea testului, o emulsie sau dispersie de substanță de testat în apă deionizată sau alt solvent se amestecă cu substratul de bază sau este pulverizată uniform peste el, cu un pulverizator de cromatografie fină sau similar.

Dacă este insolubilă în apă, substanța de testat se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform).

Se pot folosi numai agenți care se volatilizează rapid pentru a solubiliza, dispersa sau emulsiona substanța de testat. Substratul trebuie aerisit înainte de utilizare. Cantitatea de apă evaporată trebuie înlocuită. Martorul trebuie să conțină aceeași cantitate din orice aditiv.

Dacă substanța de testat nu este solubilă, dispersabilă sau emulsionabilă în solvenți organici, se amestecă 10 g de nisip de cuarț fin măcinat cu o cantitate de substanță de testat necesară pentru a trata 500 g de sol artificial uscat cu 490 g de substrat de testare uscat.

Pentru fiecare lot, o cantitate de substrat de testare umed echivalent cu 500 g greutate uscată se plasează în fiecare recipient din sticlă și 10 râme, care au fost ținute 24 de ore într-un substrat de bază umed similar, apoi clătite rapid, surplusul de apă fiind absorbit pe hârtie de filtru, sunt așezate pe substratul de testare.

**▼B**

Recipientele se acoperă cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic perforate pentru a împiedica uscarea substratului și sunt ținute în condiții de testare 14 zile.

Evaluările trebuie făcute după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului. Substratul se întinde pe o placă de sticlă sau oțel inoxidabil. Râmele se examinează și se determină numărul de râme supraviețuitoare. Râmele se consideră moarte dacă nu răspund la un stimul mecanic ușor, aplicat în extremitatea anterioară.

Dacă examinarea are loc la 7 zile, recipientul se reumple cu substrat, iar râmele supraviețuitoare se așează pe același substrat de testare.

#### 1.6.4. *Organisme de testare*

Organismele de testare trebuie să fie *Eisenia foetida* adulte (a se vedea nota din apendice) (în vârstă de cel puțin 2 luni, cu clitellum) cu o greutate umedă de 300-600 mg (pentru metoda de reproducere, a se vedea apendicele).

## 2. **DATE**

### 2.1. **INTERPRETAREA ȘI EVALUAREA REZULTATELOR**

Concentrațiile substanței de testat se raportează la procentele corespunzătoare de mortalitate a râmelor.

Dacă datele sunt adecvate, valoarea  $CL_{50}$  și limitele de încredere ( $p = 0,05$ ) se determină prin metode standard (Litchfield și Wilcoxon, 1949, pentru metoda echivalentă).  $CL_{50}$  se exprimă în mg de substanță de testat pe kg de substrat de testare (greutate uscată).

În cazurile în care panta curbei de concentrație este prea mare pentru a permite calculul  $CL_{50}$ , este suficientă o estimare grafică a acestei valori.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, cele două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află  $CL_{50}$ .

## 3. **RAPORT**

### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- declarația de conformitate a testului cu criteriile de calitate menționate mai sus;
- testul realizat (testul preliminar și/sau testul definitiv);
- descrierea exactă a condițiilor de testare sau a declarației de conformitate a testului cu metoda; trebuie raportată orice abatere;
- descrierea exactă a modului în care s-a amestecat substanța de testat în substratul de bază;
- informații despre organismele testate (specia, vârsta, media și gama de greutate, condiții de păstrare și reproducere, furnizor);

**▼B**

- metoda folosită pentru determinarea CL<sub>50</sub>;
- rezultatele testului, inclusiv toate datele folosite;
- descrierea simptomelor observate sau a modificărilor de comportament ale organismelor testate;
- mortalitatea la loturile martor;
- CL<sub>50</sub> sau cea mai mare concentrație testată fără mortalitate și concentrația minimă testată cu mortalitate de 100 % la 14 zile (și opțional 7 zile) de la începerea testului;
- trasarea curbei concentrație/răspuns;
- rezultatele obținute cu substanța de referință, fie în cadrul testului de față, fie în cel al unor teste anterioare de control al calității.

#### 4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331
3. Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671
4. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments./. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.
5. Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
6. Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, „Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

**▼B***Apendice***Reproducerea și păstrarea râmelor înainte de testare**

Pentru reproducerea organismelor, 30-50 de râme adulte sunt puse într-o cutie de reproducere, cu substrat proaspăt, și scoase după 14 zile. Aceste organisme se pot folosi ulterior pentru alte loturi de reproducere. Râmele scoase din coconi se folosesc pentru testare când ajung la maturitate (în condițiile cerute, după 2-3 luni).

**Condiții de păstrare și reproducere**

Incinta climatizată: temperatura  $20 \pm 2$  °C de preferință cu lumină continuă (intensitatea 400-800 de lucși).

Cutii de reproducere: recipiente puțin adânci, cu o capacitate de 10-20 l.

Substrat: *Eisenia foetida* se poate reproduce în diferite excremente de animale. Se recomandă să se folosească ca mediu de reproducere un amestec de 50 % volum turbă și 50 % bălegar de vacă sau cal. Mediul trebuie să aibă o valoare a pH-ului de 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu) și o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mmhos sau 0,5 % concentrație de sare).

Substratul trebuie să fie umed, dar nu foarte ud.

Se pot folosi alte metode de succes pe lângă metoda prezentată mai sus.

*Notă:* Unii taxonomiști au împărțit *Eisenia foetida* în două specii (Bouche, 1972). Acestea sunt morfologic similare, dar una, *Eisenia foetida foetida* prezintă dungi transversale tipice pe segmente, în timp ce a doua, *Eisenia foetida andrei* nu are aceste dungi și are o culoare roșiatică, cu pete. Dacă este posibil, se recomandă folosirea speciei *Eisenia foetida andrei*. Dacă este disponibilă metodologia necesară, se pot folosi alte specii.



## C.9. BIODEGRADARE

### METODA ZAHN-WELLENS

#### 1. METODĂ

##### 1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este evaluarea potențialului de biodegradabilitate totală al substanțelor organice nevolatile solubile în apă, atunci când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme într-un test static.

Pe materiile solide în suspensie poate avea loc adsorbția fizico-chimică, iar acest aspect trebuie luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea punctul 3.2).

Substanțele de studiat se folosesc în concentrații corespunzătoare valorilor COD în intervalul 50-400 mg/l, sau valorilor CCO în intervalul 100-1 000 mg/l (COD = carbon organic dizolvat; CCO = consum chimic de oxigen). Aceste concentrații relativ mari garantează o bună fiabilitate analitică. Compușii cu proprietăți toxice pot întârzia sau inhiba procesul de degradare.

În această metodă se folosește măsurarea concentrației de carbon organic dizolvat sau a consumului chimic de oxigen pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanței de testat.

Folosirea simultană a unei metode analitice specifice permite evaluarea biodegradabilității primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda este aplicabilă numai acelor substanțe organice testate care la concentrația folosită în test:

- sunt solubile în apă în condițiile de testare;
- au o presiune a vaporilor neglijabilă în condițiile de testare;
- nu sunt inhibitoare pentru bacterii;
- sunt adsorbite în sistemul de testare numai în cantități limitate;
- nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale compusului testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre acțiunea toxică a substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru selecția concentrațiilor testate corespunzătoare.

**▼B****1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

Gradul de degradare atins la sfârșitul testului se raportează ca „Biodegradabilitate în testul Zahn-Wellens”:

$$D_T(\%) = \left[ 1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

unde:

$D_T$  = gradul de biodegradare exprimat în % la momentul T,

$C_A$  = valori COD sau (CCO) în amestecul testat, măsurate la trei ore după începerea testului (mg/l) (COD = carbon organic dizolvat, CCO = consum chimic de oxigen),

$C_T$  = valori COD sau CCO în amestecul testat la momentul prelevării probelor (mg/l),

$C_B$  = valori COD sau CCO ale probei martor la momentul prelevării probelor (mg/l),

$C_{BA}$  = valorile COD sau CCO ale probei martor, măsurate la trei ore de la începerea testului (mg/l).

Gradul de degradare se rotunjește la cel mai apropiat procent întreg.

Procentul de degradare se exprimă ca procent de îndepărtare a COD (sau CCO) din substanța de testat.

Diferența dintre valoarea măsurată după trei ore și valoarea inițială calculată sau, de preferință, măsurată poate furniza informații utile cu privire la eliminarea substanței (a se vedea punctul 3.2 – Interpretarea rezultatelor).

**1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

În anumite cazuri, când se studiază substanțe noi, substanțele de referință pot fi utile; cu toate acestea, nu se pot recomanda încă substanțe de referință specifice.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Nămolul activ, substanțe nutritive minerale și substanța de testat – ca singură sursă de carbon în soluția apoasă – se introduc împreună într-un recipient din sticlă cu o capacitate de 1-4 l, prevăzut cu un dispozitiv de agitare și un aerator. Amestecul se agită și se aerează la 20-25 °C, în condiții de iluminare difuză sau într-o incintă întunecată, timp de până la 28 de zile. Procesul de degradare se monitorizează prin determinarea valorilor COD (sau CCO) în soluție filtrată, zilnic sau la alte intervale egale de timp adecvate. Raportul dintre COD (sau CCO) eliminat după fiecare interval și valoarea constatată la trei ore după începerea testului se exprimă ca procent de biodegradare și servește ca măsură a gradului de degradare în acel moment. Procentele se reprezintă grafic în funcție de timp, formând curba de biodegradare.

Atunci când se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările în concentrația moleculei primare datorate biodegradării (biodegradabilitate primară).

**▼B****1.5. CRITERII DE CALITATE**

Reproductibilitatea acestui test s-a dovedit a fi satisfăcătoare în cadrul unui test de comparație interlaboratoare.

Sensibilitatea metodei este determinată în mare măsură de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și nivelul compusului de testat în soluție.

**1.6. DESCRIEREA MODULUI DE OPERARE****1.6.1. Pregătire****1.6.1.1. Reactivi**

Apa de testare: apă potabilă cu conținut de carbon organic < 5 mg/l. Concentrația de ioni de magneziu și calciu, luate împreună, nu trebuie să depășească 2,7 mmol/l, altfel este necesară o diluare adecvată cu apă deionizată sau distilată.

|  |        |
|--|--------|
| Acid sulfuric, puritate analitică (p.a.) | 50 g/l |
|--|--------|

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Soluție de hidroxid de sodiu p.a. | 40 g/l |
|-----------------------------------|--------|

Soluție nutritivă minerală: dizolvare într-un litru de apă deionizată:

|  |        |
|--|--------|
| Clorură de amoniu, $\text{NH}_4\text{Cl}$ , p.a. | 38,5 g |
|--|--------|

|   |        |
|---|--------|
| Dihidrogenofosfat de sodiu, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.: | 33,4 g |
|---|--------|

|  |       |
|--|-------|
| Dihidrogenofosfat de potasiu, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ p.a.: | 8,5 g |
|--|-------|

|   |         |
|---|---------|
| Dipotasiu mono-hidrogen fosfat $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , p.a.: | 21,75 g |
|---|---------|

Amestecul servește atât ca substanță nutritivă, cât și ca soluție tampon.

**1.6.1.2. Aparatură**

Recipiente din sticlă cu o capacitate de 1-4 l (de exemplu, recipiente cilindrice).

Dispozitiv de agitare cu agitator din sticlă sau metal, pe un ax adecvat (agitatorul trebuie să se rotească la aproximativ 5-10 cm deasupra bazei recipientului). Se poate folosi, alternativ, un agitator magnetic cu tijă lungă de 7-10 cm.

Tub de sticlă cu diametrul interior de 2-4 mm, folosit pentru a introduce aer. Deschiderea tubului trebuie să fie de aproximativ 1 cm înălțime de la baza recipientului.

Centrifugă (aproximativ 3 550 g).

Ph-metru.

Aparat pentru măsurarea oxigenului dizolvat.

Filtre de hârtie.



**▼B**

Aparat de filtrare cu membrană.

Membrane de filtrare, cu dimensiunea porilor de 0,45 µm. Membranele de filtrare sunt adecvate dacă nu elimină carbon și nu adsorb substanța în faza de filtrare.

Echipament analitic pentru determinarea conținutului de carbon organic și a consumului chimic de oxigen.

#### 1.6.1.3. Pregătirea inoculului

Nămolul activ, provenit dintr-o stație de epurare biologică, se spală prin centrifugare (repetată) sau decantare în apa de testare (a se vedea mai sus).

Nămolul activ trebuie să fie în stare corespunzătoare. Acest nămol se poate preleva de la o stație de epurare a apei uzate aflată în bună stare de funcționare. Pentru a obține cât mai multe specii sau sușe bacteriene diferite, este preferabilă amestecarea de inocul provenit din diferite surse (de exemplu, diferite stații de epurare, extracte de sol, apă de râu etc.). Amestecul trebuie tratat conform descrierii de mai sus.

Pentru verificarea activității nămolului activ, a se vedea „Controlul funcțional” de mai jos.

#### 1.6.1.4. Pregătirea soluțiilor de testare

În recipientul de testare se adaugă: 500 ml apă de testare, 2,5 ml/l soluție nutritivă minerală, nămol activ într-o cantitate care să corespundă cu 0,2-1,0 g/l substanță uscată în amestecul final. Se adaugă suficientă soluție mamă de substanță de testat, astfel încât să se obțină în amestecul final o concentrație COD de 50-400 mg/l. Valorile CCO corespunzătoare sunt de 100-1 000 mg/l. Se adaugă apă până la un volum total de 1-4 l. Alegerea volumului total depinde de numărul de probe ce trebuie prelevate pentru determinările COD sau CCO și de volumele necesare pentru metoda analitică.

În mod normal, un volum de 2 litri poate fi considerat satisfăcător. Pentru fiecare serie de teste se prepară în paralel cel puțin un recipient cu probă martor; acesta conține numai nămol activ și soluție nutritivă minerală completată cu apă la același volum total ca în recipientele de testare.

#### 1.6.2. Mod de operare

Recipientele de testare se agită cu agitatoare magnetice sau cu elice, în condiții de iluminare difuză, sau într-o incintă întunecată, la 20-25 °C. Aerarea se face cu aer comprimat, filtrat printr-un tampon de vată și, dacă este necesar, printr-un balon de spălare. Nămolul nu trebuie să se decanteze, iar concentrația de oxigen nu trebuie să scadă sub 2 mg/l.

Valoarea pH-ului se verifică periodic (de exemplu, zilnic) și, dacă este necesar, se ajustează la pH 7-8.

**▼B**

Pierderile prin evaporare se completează chiar înaintea fiecărei prelevări de probe, cu apă deionizată sau distilată în cantitățile necesare. O bună metodă este marcarea nivelului lichidului din recipientul de testare înainte de începerea testului. Noi marcaje se fac după fiecare prelevare de probe (fără aerare și amestecare). Primele probe se prelevează întotdeauna după trei ore de la începerea testului, pentru a se decela adsorbția substanței de testat pe nămolul activ.

Eliminarea substanței de testat este urmată de determinări COD sau CCO făcute zilnic sau la alte intervale egale. Probele din recipientul de testare și proba martor sunt filtrate printr-o hârtie de filtru spălată atent. Primii 5 ml de soluție filtrată se îndepărtează. Nămolurile greu de filtrat se pot înlătura anterior prin centrifugare timp de 10 minute. Determinările COD și CCO se fac cel puțin în duplicat. Testul durează 28 de zile.

*Notă:* Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtrele cu membrană. Acestea nu trebuie să elimine sau să adsoarbă nicio substanță organică.

#### Controlul funcțional al nămolului activ

Pentru fiecare serie de teste, trebuie studiat în paralel un recipient ce conține o substanță cunoscută, astfel încât să se poată verifica capacitatea funcțională a nămolului activ. S-a observat că dietilenglicolul este util în acest scop.

#### Adaptare

Dacă analizele se efectuează la intervale relativ scurte (de exemplu, zilnic) adaptarea poate fi recunoscută în mod evident din curba de degradare (a se vedea figura 2). Din această cauză, testul nu trebuie să înceapă imediat înainte de sfârșitul săptămânii.

Dacă adaptarea are loc la sfârșitul perioadei, testul poate fi prelungit până când degradarea s-a încheiat.

*Notă:* Dacă sunt necesare cunoștințe mai ample despre comportamentul nămolului activ, același nămol activ se tratează din nou cu aceeași substanță de testat în conformitate cu metoda de mai jos:

Se oprește dispozitivul de agitare și aeratorul și se lasă nămolul activ să decanteze. Se elimină supernatantul, se umple cu până la 2 litri cu apă, se agită 15 minute și se lasă să decanteze din nou. După ce se elimină din nou supernatantul, cu nămolul rămas se repetă testul cu același compus în conformitate cu punctele 1.6.1.4 și 1.6.2 de mai sus. Nămolul activ poate fi izolat și prin centrifugare în loc de decantare.

Nămolul adaptat poate fi amestecat cu nămol proaspăt într-o concentrație de 0,2-1 g substanță uscată pe litru.

**▼B****Mijloace analitice**

În mod normal, probele se filtrează printr-o hârtie de filtru spălată atent (pentru spălare se folosește apă deionizată).

Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtre cu membrană (0,45 µm).

Concentrația COD se determină pe probe duplicate din eşantioanele filtrate (primii 5 ml sunt înlăturați) cu ajutorul analizorului TOC (*total organic carbon*). Dacă filtratul nu poate fi analizat în aceeași zi, acesta trebuie păstrat în frigider până în ziua următoare. Nu se recomandă o depozitare mai îndelungată.

Concentrația CCO se determină în proba filtrată prin metoda analitică CCO inițiată de procedura descrisă în referința bibliografică 2 de mai jos.

**2. DATE ȘI EVALUARE**

Concentrațiile COD și/sau CCO se determină cel puțin de două ori pe probe conform punctului 1.6.2 de mai sus. Degradarea la momentul T se calculează conform formulei (cu definiții) date la punctul 1.2 de mai sus.

Gradul de degradare se rotunjește la procentul întreg cel mai apropiat. Gradul de degradare atins la sfârșitul testului constituie „biodegradabilitatea Zahn Wellens”.

*Notă:* Dacă are loc o degradare completă înainte de expirarea duratei testului, iar acest rezultat este confirmat de o a doua analiză efectuată în ziua următoare, testul poate fi încheiat.

**3. RAPORT****3.1. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- concentrația inițială a substanței;
- toate celelalte informații și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință, după caz, și proba martor;
- concentrația după trei ore;
- curba de biodegradare cu descriere;
- data și locul de unde s-a prelevat nămolul activ, stadiul de adaptare, concentrația folosită etc.;
- argumentele științifice pentru orice modificare a metodei de testare.

**3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Eliminarea COD (CCO) care are loc treptat după zile sau săptămâni indică faptul că substanța de testat se biodegradează.

**▼B**

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate să joace un rol în unele cazuri și acest lucru este indicat de existența unei eliminări complete sau parțiale de la început, în primele trei ore, iar diferența dintre maritor și supernatantul de testare rămâne la un nivel neașteptat de scăzut.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste suplimentare.

În acest scop există mai multe metode, însă cea mai convingătoare este utilizarea supernatantului sau a nămolului ca agent de inoculare într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care duc la o eliminare avansată neadsorbțivă a COD (CCO) în acest test trebuie considerate ca potențial biodegradabile. Eliminarea parțială, neadsorbțivă, arată că substanța chimică este cel puțin biodegradabilă într-o anumită măsură. Eliminările reduse sau nule ale COD (CCO) se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat, acest lucru fiind indicat de liză și pierderea de nămol din care rezultă supernatanți tulburi. Testul se repetă cu o concentrație mai scăzută de substanță de testat.

Folosirea unei metode analitice specifice pentru compusul de testat sau a unei substanțe de testat marcate cu  $^{14}\text{C}$  permite o sensibilitate mai mare. În cazul compusului marcat cu  $^{14}\text{C}$ , recuperarea  $^{14}\text{CO}_2$  confirmă că biodegradarea a avut loc.

Dacă rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, trebuie să se furnizeze, în măsura în care este posibil, o explicație cu privire la modificarea structurii chimice care duce la diminuarea răspunsului substanței inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut de la proba maritor.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decision of the Council (81) 30 final.
2. Anexa V C.6. *Degradarea – Consumul chimic de oxigen*. Directiva 92/69/CEE a Comisiei, Jurnalul Oficial al Comunităților Europene L 383, 29.12.1992, p. 1.



# Apendice

## EXEMPLU DE EVALUARE

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Compus organic:         | 4-acid etoxibenzoic  |
| Concentrația teoretică: | 600 mg/l   |
| COD teoretic:           | 390 mg/l   |
| Inocul                  | instalația de epurare a apei uzate ...   |
| Concentrație:           | 1 g material uscată/l  |
| Adaptare:               | neadaptat  |
| Analiza:                | determinarea DOC   |
| Cantitatea de probă:    | 3 ml   |
| Substanța martor:       | dietilenglicol   |
| Toxicitatea compusului: | niciun efect toxic sub 1 000 mg/l<br>Metoda utilizată: test cu tuburi de fermentație |

| Durata testului | Substanța martor                              |                            |                 |                | Substanța de testat        |                 |                |
|-----------------|---|----------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------------|----------------|
|                 | Proba<br>martor<br>DOC <sup>(1)</sup><br>mg/l | DOC <sup>(1)</sup><br>mg/l | DOC net<br>mg/l | Degradare<br>% | DOC <sup>(1)</sup><br>mg/l | DOC net<br>mg/l | Degradare<br>% |
| 0               | —   | —                          | 300,0           | —              | —                          | 390,0           | —              |
| 3 ore           | 4,0   | 298,0                      | 294,0           | 2,0            | 371,6                      | 367,6           | 6              |
| 1 zi            | 6,1   | 288,3                      | 282,2           | 6              | 373,3                      | 367,2           | 6              |
| 2 zile          | 5,0   | 281,2                      | 276,2           | 8              | 360,0                      | 355,0           | 9              |
| 5 zile          | 6,3   | 270,5                      | 264,2           | 12             | 193,8                      | 187,5           | 52             |
| 6 zile          | 7,4   | 253,3                      | 245,9           | 18             | 143,9                      | 136,5           | 65             |
| 7 zile          | 11,3  | 212,5                      | 201,2           | 33             | 104,5                      | 93,2            | 76             |
| 8 zile          | 7,8   | 142,5                      | 134,7           | 55             | 58,9                       | 51,1            | 87             |
| 9 zile          | 7,0   | 35,0                       | 28,0            | 91             | 18,1                       | 11,1            | 97             |
| 10 zile         | 18,0  | 37,0                       | 19,0            | 94             | 20,0                       | 2,0             | 99             |

<sup>(1)</sup> Valori medii ale determinărilor efectuate de trei ori.

▼B

Figura 1

## Exemple de curbe de biodegradabilitate

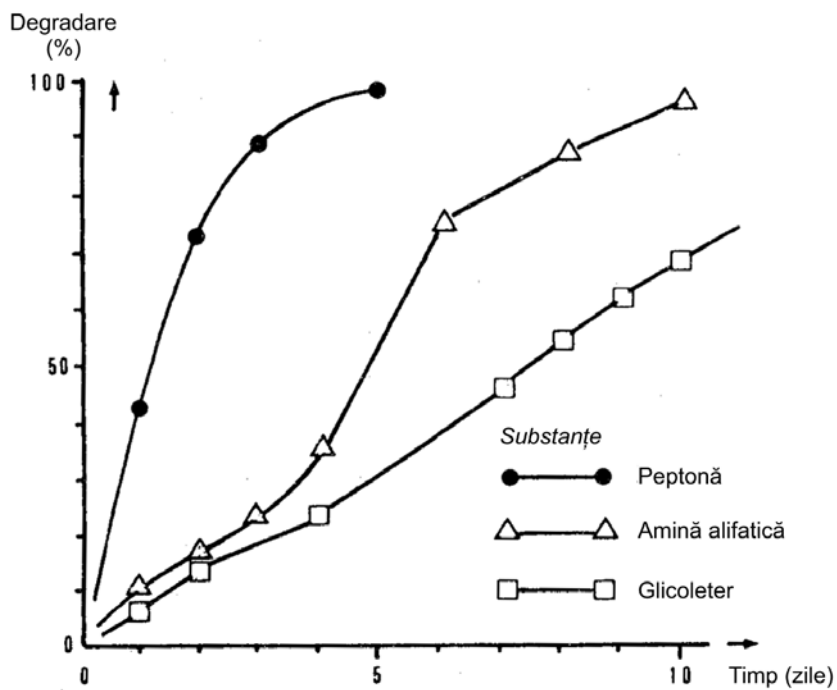
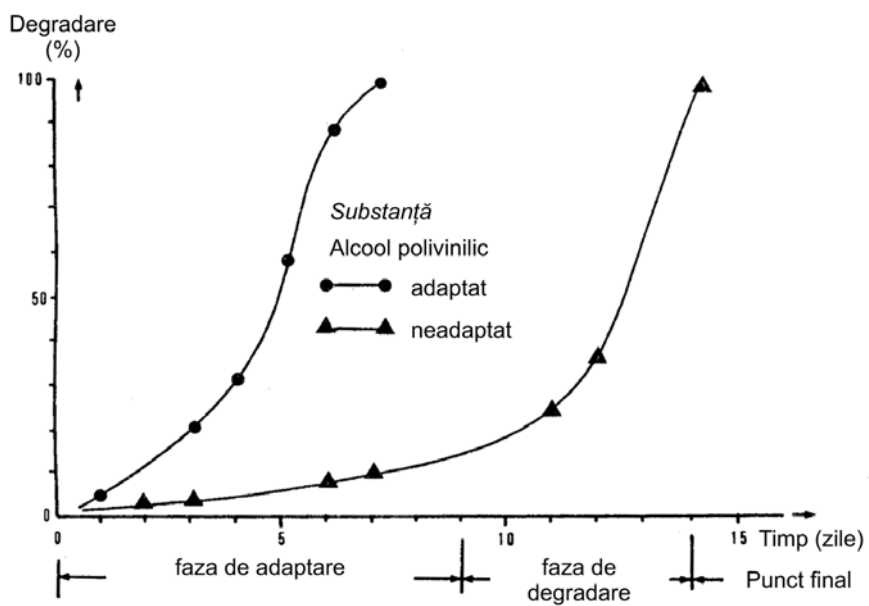


Figura 2

## Exemple de adaptare a nămolului



## ▼M4

**C.10. TEST DE SIMULARE – TRATAREA AEROBĂ A APELOR  
UZATE: C.10-A: UNITĂȚI CU NĂMOL ACTIV – C.10-B:  
BIOPELICULE**

**C.10-A: Unități cu nămol activ**

**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 303 (2001) a OCDE. În anii 1950 s-a ajuns la concluzia că agenții tensioactivi nou introduși produceau spumare excesivă în stațiile de epurare a apei și în râuri. Aceștia nu au fost eliminați complet prin tratarea aerobă și în unele cazuri au limitat eliminarea altor materii organice. Această situație a determinat mai multe analize privind modul în care agenții tensioactivi ar putea fi eliminați din apele uzate și pentru a vedea dacă noile substanțe chimice produse de industrie se pretează pentru tratarea apelor uzate. În acest scop, s-au utilizat unități model care reprezintă cele două tipuri principale de tratare biologică aerobă a apelor uzate (nămol activ și filtrare cu stropire sau percolare). Ar fi fost nepractic și foarte costisitor să se distribuie fiecare substanță chimică nouă și să se monitorizeze instalațiile de epurare de mari dimensiuni, chiar și pe plan local.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

**Unități cu nămol activ**

2. Modelele de unități cu nămol activ au fost descrise ca având dimensiuni de la 300 ml până la circa 2 000 ml. Unele modele au reprodus îndeaproape instalații industriale, cu rezervoare de decantare a nămolului, nămolul decantat fiind pompat înapoi în vasul de aerare, în timp ce altele nu aveau instalații de decantare, de exemplu Swisher (1). Dimensiunea aparatului este un compromis; pe de o parte, trebuie să fie suficient de mare pentru o funcționare mecanică reușită și pentru a furniza un volum suficient de probe fără să afecteze funcționarea, iar pe de altă parte nu trebuie să fie atât de mare încât să necesite spațiu și materiale excesive.
3. Două tipuri de aparate care au fost utilizate pe scară largă și cu rezultate satisfăcătoare sunt unitățile Husmann (2) și unitățile de tip „vas poros” (3) (4), utilizate mai întâi în studiul agenților tensioactivi; acestea sunt descrise în această metodă de testare. Au mai fost utilizate și alte tipuri de unități cu rezultate satisfăcătoare, de exemplu unitățile Eckenfelder (5). Din cauza costului relativ ridicat și a efortului de aplicare a acestui test de simulare, s-au investigat în paralel teste de screening mai simple și mai ieftine, care acum sunt integrate în capitolul C.4 A-F din prezenta anexă (6). Experiența cu mulți agenți tensioactivi și alte substanțe chimice a arătat că cele care treceau testele de screening (ușor biodegradabile) se degradau și în testul de simulare. Unele din cele care nu au trecut testele de screening au trecut testele de biodegradabilitate intrinsecă [capitolul C.12 (7) și capitolul C.19 (8) din prezenta anexă], dar numai unele din acest al doilea grup au fost degradate în testul de simulare, în timp ce acele substanțe chimice care nu au trecut testele de biodegradabilitate intrinsecă nu s-au degradat în testele de simulare (9) (10) (11).
4. În unele scopuri sunt suficiente testele de simulare efectuate în cadrul unui singur set de condiții de funcționare; rezultatele sunt exprimate ca eliminare procentuală a substanței chimice testate sau a carbonului organic dizolvat (COD). Această metodă de testare oferă o descriere a unui astfel de test. Totuși, spre deosebire de versiunea anterioară a prezentului capitol, care descria un singur tip de aparat de tratare a apelor uzate sintetice în

▼ **M4**

regimul cu instalații cuplate, care utilizează o metodă relativ brută a surplusului de nămol, acest text prezintă o serie de variații. Sunt descrise alternative la tipul de aparat, modul de funcționare, eliminarea surplusului de ape uzate și nămol. Prezentul text respectă îndeaproape textul din ISO 11733 (12), care a fost verificat cu minuțiozitate în timpul pregătirii sale, cu toate că metoda nu a fost supusă unui test de comparare interlaboratoare.

5. În alte scopuri, concentrația în efluent a substanței chimice testate trebuie să fie cunoscută cu mai multă precizie, de aceea este nevoie de o metodă mai extinsă. De exemplu, rata de pierdere a surplusului de nămol trebuie să fie controlată mai precis pe parcursul fiecărei zile și pe întreaga perioadă de testare, iar unitățile trebuie să funcționeze la mai multe rate de pierdere. Pentru o metodă cu adevărat completă, testele ar trebui să fie efectuate, de asemenea, la două sau trei temperaturi diferite: o astfel de metodă este descrisă de Birch (13) (14) și sintetizată în apendicele 6. Totuși, cunoștințele actuale sunt insuficiente pentru a decide care dintre modelele cinetice pot fi aplicate la biodegradarea substanțelor chimice în tratarea apelor uzate și în general în mediul acvatic. Aplicarea cineticii Monod, indicată ca exemplu în apendicele 6, se limitează la substanțele chimice prezente într-o concentrație de cel puțin 1 mg/l, dar în opinia unor specialiști chiar și acest lucru rămâne de demonstrat. Testele la concentrații care reflectă mai îndeaproape pe cele din apele uzate sunt indicate în apendicele 7, dar astfel de teste, ca și cele din apendicele 6, sunt incluse în apendice, fără să fie prezentate ca metode de testare separate.

*Filtre*

6. S-a acordat mult mai puțină atenție filtrelor de percolare utilizate ca model, probabil pentru că ocupă mai mult spațiu și sunt mai puțin compacte decât modelele de instalații cu nămol activ. Gerike *et al.* au dezvoltat unități de filtrare cu percolare și le-au exploatat în regim cu instalații cuplate (15). Aceste filtre erau destul de mari (înălțime 2 m; volum 60 l) și pentru fiecare era nevoie de un debit de ape uzate de 2 l/h. Baumann *et al.* (16) au simulat filtrele de percolare prin inserarea de fâșii de material din poliester tip „fleece” în tuburi de 1 m lungime (diametru interior 14 mm), după scufundarea fâșiilor timp de 30 de minute în nămol activ concentrat. Alimentarea cu substanța chimică testată, ca unică sursă de C într-o soluție de săruri minerale, se făcea printr-un tub vertical, iar biodegradarea era evaluată pe baza măsurării COD în efluent și a CO<sub>2</sub> în gazul evacuat.
7. Biofiltrele au fost simulate în alt mod (15); suprafețele interioare ale tuburilor rotative, înclinate la un unghi mic față de orizontală, au fost alimentate cu ape uzate (circa 250 ml/h), cu și fără substanța chimică testată specifică, iar efluenții colectați au fost analizați pentru COD și/sau substanța chimică specifică testată.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

8. Această metodă este concepută pentru a determina eliminarea și biodegradarea primară și/sau finală a substanțelor chimice organice solubile în apă de către microorganisme aerobe, într-un sistem de testare cu funcționare continuă, care simulează procesul cu nămol activ. Un mediu organic ușor biodegradabil și substanța chimică organică testată reprezintă sursele de carbon și energie pentru microorganisme.
9. Două unități de testare cu funcționare continuă (instalații cu nămol activ sau vase poroase) funcționează în paralel, în condiții identice, care sunt alese pentru a corespunde scopului testului. În mod normal, timpul mediu de retenție hidraulică este de 6 h iar vârsta medie a nămolului (timpul de retenție a nămolului) este de 6 până la 10 zile. Nămolul este înlăturat prin una din cele două metode, substanța chimică testată se adaugă, în mod normal, la o concentrație între 10 mg/l de carbon organic dizolvat (COD) și 20 mg/l COD, la influentul (mediul organic) numai uneia dintre unități. A doua unitate este utilizată ca unitate de control pentru determinarea biodegradării mediului organic.



## ▼ M4

10. În probele prelevate frecvent din efluenți se determină COD, de preferință, sau consumul chimic de oxigen (CCO), împreună cu concentrația substanței chimice testate (dacă este nevoie) prin analiză specifică, în efluentul de la unitatea care primește substanța chimică testată. Se consideră că diferența dintre concentrațiile din efluenți ale COD sau CCO în unitățile de testare și de control este datorată substanței chimice testate sau metaboliților săi organici. Această diferență este comparată cu concentrația de COD sau CCO în influent datorată substanței chimice testate adăugate, pentru a determina eliminarea substanței chimice testate.
11. În mod normal, biodegradarea poate fi deosebită de bioadsorbție prin examinarea atentă a curbei eliminare-timp și în general poate fi confirmată prin aplicarea unui test pentru biodegradare rapidă, utilizând un inocul acclimatizat din unitatea care primește substanța chimică testată.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

12. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice testate. În mod normal, substanțele chimice volatile și insolubile nu pot fi testate fără a se lua măsuri speciale de precauție (a se vedea appendicele 5). Trebuie să se cunoască și structura chimică sau cel puțin formula empirică pentru a calcula valorile teoretice și/sau pentru a verifica valorile măsurate ale parametrilor, de exemplu consumul teoretic de oxigen (CTO), carbonul organic dizolvat (COD) și consumul chimic de oxigen (CCO).
13. Informațiile legate de toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (a se vedea appendicele 4) pot fi utile pentru alegerea concentrațiilor de testare adecvate și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor scăzute de biodegradare.

## NIVELURI DE TRECERE

14. În aplicarea originală a acestui test de simulare (de confirmare) la biodegradarea primară a agenților tensioactivi este necesară înlăturarea a mai mult de 80 % din substanța chimică specifică înainte ca agentul tensioactiv să poată fi comercializat. În cazul în care nu se atinge valoarea de 80 %, testul de simulare (de confirmare) poate fi aplicat, iar agentul tensioactiv se poate comercializa numai dacă se înlătură mai mult de 90 % din substanța chimică specifică. În general, la substanțele chimice nu se pune problema de a trece sau a nu trece testul, iar valoarea eliminării procentuale obținute poate fi utilizată în calcule aproximative ale concentrației probabile în mediu, care urmează să fie utilizate în evaluarea riscurilor implicate de substanțele chimice. Rezultatele tind să urmeze un tipar de tipul „totul sau nimic”. Într-o serie de studii privind substanțe chimice pure s-a constatat că procentul de eliminare a COD era > 90 % în mai mult de trei sferturi și > 80 % în peste 90 % din substanțele chimice, ceea ce a indicat un grad semnificativ de biodegradabilitate.
15. Relativ puține substanțe chimice (de exemplu, agenți tensioactivi) sunt prezente în apele uzate în concentrațiile (circa 10 mg C/l) utilizate în acest test. La aceste concentrații, unele substanțe chimice pot fi inhibitoare, în timp ce cinetica eliminării altor substanțe poate fi diferită la concentrații scăzute. O evaluare mai precisă a degradării s-ar putea face cu ajutorul unor metode modificate, utilizând concentrații de substanță chimică testată realist scăzute, iar datele culese ar putea fi utilizate pentru calculul constantelor cinetice. Totuși, tehnicile experimentale necesare nu au fost încă pe deplin validate și nici nu s-au stabilit modelele cinetice care descriu reacțiile de biodegradare (a se vedea appendicele 7).

▼ **M4****SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ**

16. Pentru a asigura executarea corectă a procedurii experimentale, ocazional este util ca analiza substanțelor chimice testate să se facă simultan cu testarea unor substanțe chimice cu comportament cunoscut. Printre aceste substanțe se numără acidul adipic, 2-fenil-fenolul, 1-naftolul, acidul difenic, acidul 1-naftoic etc. (9) (10) (11).

**REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII**

17. Există mult mai puține rapoarte privind studii despre teste de simulare decât despre teste pentru biodegradabilitate rapidă. Reproducibilitatea între duplicate (simultane) este bună (în limita a 10-15 %) pentru substanțe chimice testate degradate în procent de cel puțin 80 %, dar pentru substanțe chimice mai puțin degradate gradul de variație este mai mare. De asemenea, la unele substanțe chimice de limită s-au înregistrat rezultate foarte variate (de exemplu, 10 %, 90 %) în diferite ocazii în perioada celor 9 săptămâni în care s-a desfășurat testul.
18. S-au înregistrat diferențe mici între rezultatele obținute cu cele două tipuri de aparate, dar unele substanțe chimice s-au degradat mai mult și în mod constant în prezența apelor uzate de origine menajeră decât în cazul apelor uzate sintetice din testele OCDE.

**DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Aparatură***Sistem de testare*

19. Sistemul de testare pentru o substanță chimică testată este format dintr-o unitate de testare și o unitate de control; dar atunci când se fac doar analize specifice (biodegradare primară), este nevoie doar de o unitate de testare. O unitate de control se poate utiliza pentru mai multe unități de testare care primesc fie aceeași substanță chimică testată, fie substanțe chimice testate diferite. În cazul cuplării unităților (apendicele 3), fiecare unitate de testare trebuie să aibă propria unitate de control. Sistemul de testare poate fi un model de instalație cu nămol activ, o unitate Husmann (apendicele 1, figura 1) sau un vas poros (apendicele 1, figura 2). În ambele cazuri sunt necesare vase de alimentare de mărime suficientă pentru influenți și efluenți, precum și pompe pentru dozarea influentului, fie amestecat cu soluția de substanță chimică testată, fie separat.
20. Fiecare instalație cu nămol activ este formată dintr-un vas de aerare cu o capacitate cunoscută de circa 3 litri de nămol activ și un separator (decantor secundar) cu o capacitate de circa 1,5 litri; volumele pot fi modificate, într-o oarecare măsură, prin ajustarea înălțimii separatorului. Sunt permise vase de dimensiuni diferite, cu condiția să fie utilizate la sarcini hidraulice comparabile. În cazul în care temperatura din camera de testare nu poate fi menținută în intervalul dorit, se recomandă utilizarea vaselor cu manta cu apă, cu temperatură controlată. Se utilizează o pompă de evacuare cu aer comprimat sau o pompă de dozare pentru reciclarea nămolului activ din separator spre vasul de aerare, fie în mod continuu, fie intermitent, la intervale regulate.
21. Sistemul cu vas poros constă într-un cilindru poros interior, cu fund conic, amplasat într-un vas ceva mai mare de aceeași formă, dar fabricat dintr-un material plastic impermeabil. Un material adecvat pentru vasul poros este polietilena poroasă, cu o dimensiune maximă a porilor de 90 μm și grosime de 2 mm. Separarea nămolului de mediul organic tratat se face prin trecerea diferențială prin peretele poros. Efluenții se colectează în spațiul inelar, de unde se revărsă în vasul de colectare. Nu se produce decantare, deci nu apare retur de nămol. Întregul sistem poate fi montat într-o baie de apă cu control termostatic. În fazele inițiale, vasele poroase se blochează și se pot revărsa.

▼ **M4**

Într-o astfel de situație se înlocuiește căptușeala poroasă cu una curată, mai întâi prin sifonarea nămolului din vas într-o găleată curată și înlăturarea căptușelii blocate. După ștergerea temeinică a cilindrului exterior impermeabil se inserează o căptușeală curată și apoi se toarnă nămolul la loc în vas. De asemenea, se curăță bine și se înlătură orice rest de nămol care aderă la pereții căptușelii blocate. Vasele blocate se curăță mai întâi cu ajutorul unui jet fin de apă pentru a elimina resturile de nămol, apoi prin înmuiere în soluție diluată de hipoclorit de sodiu, apoi în apă, după care se clătesc bine cu apă.

22. Pentru aerarea nămolului în vasele de aerare din ambele sisteme este nevoie de tehnici adecvate, de exemplu cuburi din material sinterizat (pietre de difuzare) și aer comprimat. Aerul trebuie să fie curățat, dacă este necesar, prin trecerea printr-un filtru adecvat și apoi trebuie să fie spălat. Prin sistem trebuie să treacă suficient aer pentru a menține condiții aerobe și pentru a păstra precipitatele floconoase de nămol în suspensie pe toată durata testului.

*Aparat de filtrare sau centrifugă*

23. Dispozitiv de filtrare a probelor cu filtre cu membrană de porozitate corespunzătoare (diametrul deschiderii nominale de 0,45  $\mu\text{m}$ ), care adsorb substanțele chimice organice și eliberează carbon organic la un nivel minim. Atunci când se utilizează filtre care eliberează carbon organic, ele trebuie să fie spălate cu grijă cu apă caldă, pentru a înlătura carbonul organic lixivibil. Ca alternativă, se poate utiliza și o centrifugă care poate produce o accelerație de 40 000  $\text{m/s}^2$ .

*Echipamente pentru analiză*

24. Aparat necesar pentru a determina:
- COD (carbon organic dizolvat) și COT (carbon organic total) sau CCO (consum chimic de oxigen);
  - substanțele chimice specifice, dacă este necesar;
  - materiile solide în suspensie, pH, concentrația de oxigen în apă;
  - temperatura, aciditatea și alcalinitatea;
  - conținutul de amoniu, nitriți și nitrați, în cazul în care testul se face în condiții nitrificatoare.

*Apă*

25. Apă de la robinet, cu conținut de COD mai mic de 3 mg/l. Trebuie să se determine alcalinitatea, atunci când nu este deja cunoscută.
26. Apă deionizată, cu conținut de COD mai mic de 2 mg/l.

*Mediu organic*

27. Ca mediu organic se poate utiliza apă uzată sintetică, apă uzată menajeră sau un amestec din cele două. S-a demonstrat (11) (14) că numai prin utilizarea apei uzate menajere se ajunge deseori la un procent crescut de eliminare a COD și chiar se permit eliminarea și biodegradarea unor substanțe chimice care nu sunt biodegradate atunci când se utilizează apa uzată sintetică din testele OCDE. De asemenea, adăugarea constantă sau intermitentă de apă uzată menajeră conduce adesea la stabilizarea nămolului activ, inclusiv la capacitatea esențială de decantare satisfăcătoare. Astfel, se recomandă utilizarea apei uzate menajere. Trebuie să se măsoare concentrația de COD sau CCO în fiecare lot nou de mediu organic. Trebuie să se cunoască aciditatea sau alcalinitatea mediului organic. În cazul în care mediul organic are o aciditate sau alcalinitate scăzută, ar putea fi necesar să se adauge o soluție tampon corespunzătoare (bicarbonat de sodiu sau fosfat diacid de potasiu), pentru a menține un pH de circa  $7,5 \pm 0,5$  în vasul de aerare în timpul testului. Cantitatea de soluție tampon care se adaugă, precum și momentul adăugării, sunt decise pentru fiecare caz în parte. Atunci când se utilizează amestecuri, fie în mod continuu, fie intermitent, COD (sau CCO) al amestecului trebuie să fie menținut la o valoare aproximativ constantă, de exemplu prin diluare cu apă.

▼ **M4***Apa uzată sintetică*

28. În fiecare litru de apă de la robinet se dizolvă: peptonă, 160 mg; extract de carne, 110 mg; uree, 30 mg; fosfat acid de di-potasiu anhidru ( $K_2HPO_4$ ), 28 mg; clorură de sodiu (NaCl), 7 mg; clorură de calciu dihidrat ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 4 mg; sulfat de magneziu heptahidrat ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ), 2 mg. Această apă uzată sintetică din testele OCDE este un exemplu și indică o concentrație medie a COD în influent de circa 100 mg/l. Ca metodă alternativă, se pot utiliza alte amestecuri, cu aproximativ aceeași concentrație de COD, care sunt apropiate de apele uzate reale. În cazul în care este nevoie de un influent mai puțin concentrat, apa uzată sintetică se diluează, de exemplu în proporție de 1:1, cu apă de la robinet, pentru a obține o concentrație de circa 50 mg/l. Un astfel de influent mai slab va oferi condiții mai bune de creștere a organismelor nitrificatoare și această modificare trebuie să fie utilizată în cazul în care se analizează simularea instalațiilor de tratare a apelor uzate prin nitrificare. Apa uzată sintetică poate fi obținută din apă distilată într-o formă concentrată și poate fi depozitată la circa 1 °C până la o săptămână. Atunci când este nevoie să fie utilizată, se diluează cu apă de la robinet. (Acest mediu nu este satisfăcător, de exemplu concentrația de azot este foarte mare, conținutul de carbon este relativ scăzut, dar nu s-a propus nicio altă metodă mai bună, cu excepția adăugării unei cantități mai mari de fosfat ca soluție tampon și a creșterii procentului de peptonă).

*Apa uzată menajeră*

29. Se utilizează apă uzată proaspătă decantată, colectată zilnic dintr-o instalație de tratare care primește în special apă uzată menajeră. Apa trebuie să fie colectată, înainte de sedimentarea primară, din canalul deversor al rezervorului de sedimentare primară sau din alimentarea instalației de nămol activ și trebuie să fie, în mare măsură, lipsită de particule grosiere. Apa uzată poate fi utilizată după ce a fost depozitată timp de mai multe zile (dar, în general, nu trebuie să se depășească șapte zile) la circa 4 °C, dacă s-a dovedit că COD (sau CCO) nu a scăzut în mod semnificativ (adică cu mai puțin de 20 %) în timpul perioadei de depozitare. Pentru a limita perturbațiile aduse sistemului, COD (sau CCO) din fiecare lot nou trebuie să fie ajustat înainte de utilizare la o valoare constantă adecvată, de exemplu prin diluarea cu apă de la robinet.

*Nămol activ*

30. Nămolul activ pentru inoculare se colectează din bazinul de aerare al unei instalații de epurare a apelor uzate care funcționează corespunzător sau dintr-o unitate de laborator cu nămol activ, care tratează în principal ape uzate menajere.

*Soluții stoc de substanță chimică testată*

31. Pentru substanțe chimice cu solubilitate adecvată, se prepară soluții stoc de concentrații corespunzătoare (de exemplu, de la 1 până la 5 g/l) în apă deionizată sau în partea minerală a apei uzate sintetice (pentru substanțe chimice insolubile și volatile, a se vedea appendicele 5). Se determină COD și carbonul organic total (COT) ale soluției stoc și se repetă măsurătorile pentru fiecare lot nou. În cazul în care diferența dintre COD și COT este mai mare de 20 %, se verifică solubilitatea în apă a substanței chimice testate. Se compară COD sau concentrația substanței chimice testate măsurate prin analiza specifică a soluției stoc cu valoarea nominală, pentru a verifica dacă recuperarea este suficient de bună (în mod normal se poate aștepta o valoare > 90 %). Se verifică, în special pentru dispersii, dacă COD poate fi utilizat sau nu ca parametru analitic sau dacă pentru substanța chimică testată se poate utiliza doar o tehnică de analiză specifică. Pentru dispersii este necesară centrifugarea probelor. Pentru fiecare lot nou se măsoară COD, CCO sau substanța chimică testată, printr-o analiză specifică.

▼ **M4**

32. Se determină pH-ul soluției stoc. Valorile extreme indică faptul că adăugarea substanței chimice poate avea o influență asupra pH-ului nămolului activ în sistemul de testare. În acest caz, soluția stoc se neutralizează, pentru a obține un pH de  $7 \pm 0,5$ , cu mici cantități de acid sau bază anorganică, dar se evită precipitarea substanței chimice testate.

**PROCEDURĂ**

33. Procedura este descrisă pentru instalațiile cu nămol activ; ea trebuie să fie ușor adaptată pentru sistemul cu vas poros.

*Prepararea inoculului*

34. Sistemul de testare se inoculează la începutul testului, fie cu nămol activ, fie cu un inocul cu concentrație scăzută de microorganisme. Până la utilizare, inoculul se păstrează aerat la temperatura camerei și se utilizează în termen de 24 de ore. În primul caz, se prelevează o probă de nămol activ din bazinul de aerare al unei instalații de epurare biologică a apelor uzate care funcționează eficient sau al unei instalații de tratare de laborator, care primește în principal apă uzată menajeră. În cazul în care se simulează condiții de nitrificare, nămolul se ia dintr-o instalație de epurare a apelor uzate prin nitrificare. Se determină concentrația de materii solide în suspensie și, dacă este necesar, se concentrează nămolul prin decantare, astfel încât volumul adăugat la sistemul de testare să fie minim. Se asigură o concentrație inițială de substanță uscată de circa 2,5 g/l.
35. În al doilea caz, se utilizează ca inocul de la 2 ml/l până la 10 ml/l dintr-un efluent de la o instalație de epurare biologică a apelor uzate menajere. Pentru a obține cât mai multe specii diferite de bacterii, poate fi utilă adăugarea de inocul din diverse alte surse, de exemplu din ape de suprafață. În acest caz, nămolul activ se va dezvolta și va crește în sistemul de testare.

*Dozarea mediului organic*

36. Se asigură curățarea temeinică a recipientelor pentru influent și efluent și a tuburilor de la vasele pentru influent și către vasele pentru efluent, pentru a înlătura creșterea microbiană inițială și pe parcursul testului. Sistemele de testare se asamblează într-o încăpere cu temperatură controlată (în mod normal, între 20 și 25 °C) sau se utilizează unități de testare cu manta cu apă. Se prepară un volum suficient din mediul organic necesar (punctele 27-29). Inițial, vasul de aerare și separatorul se umplu cu mediul organic și se adaugă inoculul (punctele 34, 35). Se începe aerarea astfel încât nămolul să fie menținut în suspensie și într-o stare aerobă și se începe dozarea influentului și reciclarea nămolului decantat. Se dozează mediul organic din vasele de alimentare în vasele de aerare (punctele 20, 21) ale unităților de testare și de control și se colectează efluenții respectivi în vase de alimentare similare. Pentru a obține un timp de retenție hidraulică normal de 6 h, mediul organic este pompat cu un debit de 0,5 l/h. Pentru confirmarea acestui debit, se măsoară cantitatea zilnică de mediu organic dozat, notând reducerea volumelor mediului în vasele de alimentare. Alte moduri de dozare sunt necesare pentru determinarea efectelor degajării intermitente și a încărcării substanțelor chimice în doze „șoc”.
37. Atunci când mediul organic este preparat pentru a fi utilizat pe o perioadă mai mare de o zi, este necesar să fie răcit la circa 4 °C sau să se folosească alte metode de conservare pentru prevenirea creșterii microbiene și a biodegradării în exteriorul unităților de testare (punctul 29). Atunci când se utilizează apă uzată sintetică, se poate prepara și depozita la circa 4 °C o soluție stoc concentrată (de exemplu, de 10 ori concentrația normală, punctul 28). Înainte de utilizare, această soluție stoc poate fi amestecată bine cu un volum corespunzător de apă de la robinet; sau poate fi pompată direct, în timp ce se pompează separat volumul corespunzător de apă de la robinet.

▼ **M4***Dozarea substanței chimice testate*

38. Se adaugă un volum corespunzător de soluție stoc din substanța chimică testată (punctul 31) la vasul de alimentare pentru influent sau se dozează direct în vasul de aerare, cu o pompă separată. Concentrația de testare medie normală în influent trebuie să fie între 10 mg/l și 20 mg/l COD, cu o concentrație maximă de cel mult 50 mg/l. În cazul în care solubilitatea în apă a substanței chimice testate este scăzută sau dacă pot apărea efecte toxice, se reduce concentrația la 5 mg/l COD sau chiar mai puțin, dar numai atunci când este disponibilă și se utilizează o metodă analitică specifică corespunzătoare (se pot adăuga substanțe chimice testate dispersate și greu solubile în apă, cu ajutorul unor tehnici de dozare speciale, a se vedea apendicele 5).
39. Se începe adăugarea substanței chimice testate după o perioadă în care sistemul s-a stabilizat și se elimină eficient COD din mediul organic (circa 80 %). Este important să se verifice dacă toate unitățile funcționează la fel de eficient înainte de adăugarea substanței chimice testate; în caz contrar, de obicei este util să se amestece nămolurile individuale și să se redistribuie volume egale la unitățile individuale. Atunci când se folosește un inocul de nămol activ de (circa) 2,5 g/l (greutate uscată), substanța chimică testată se poate adăuga de la începutul testului, deoarece adăugarea directă, de la început, a unor cantități din ce în ce mai mari are avantajul că nămolul activ se poate adapta mai bine la substanța chimică testată. Indiferent de metoda de adăugare a substanței chimice testate, se recomandă măsurarea la intervale regulate a debitului relevant și/sau a volumelor din vasul (vasele) de alimentare.

*Manipularea nămolului activ*

40. În mod normal, concentrația de materii solide în nămolul activ se stabilizează între anumite limite în timpul testului, independent de inoculul folosit, între 1 și 3 g/l (greutate uscată), în funcție de calitatea și concentrația mediului organic, de condițiile de funcționare, de natura microorganismelor prezente și de influența substanței chimice testate.
41. Fie se determină materiile solide în suspensie în vasele de aerare cel puțin o dată pe săptămână și se elimină nămolul în exces pentru a se menține concentrația la o valoare între 1 g/l și 3 g/l (greutate uscată), fie se controlează vârsta medie a nămolului la o valoare constantă, de obicei între 6 și 10 zile. De exemplu, dacă se alege un timp de retenție a nămolului de 8 zile, se scoate zilnic 1/8 din volumul nămolului activ din vasul de aerare și se elimină. Se face acest lucru zilnic sau, de preferință, printr-o pompă automată cu funcționare intermitentă. Prin menținerea unei concentrații de materii solide în suspensie la o valoare constantă sau între niște limite înguste nu se menține un timp constant de retenție a nămolului (TRN), care este variabila de funcționare ce determină valoarea concentrației substanței chimice testate în efluent.
42. Pe toată durata testului se înlătură, cel puțin o dată pe zi, orice nămol care aderă la pereții vasului de aerare și ai separatorului, astfel încât să se refacă suspensia. Se verifică și se curăță regulat toate tuburile și țevile, pentru a preveni dezvoltarea biopeliclei. Nămolul decantat din separator spre vasul de aerare se reciclează, de preferință prin pompare intermitentă. În sistemul cu vas poros nu are loc reciclare, dar trebuie să se asigure inserarea de vase interioare curate înainte ca volumul din vase să crească semnificativ (punctul 21).
43. În unitățile Husmann, decantarea poate fi necorespunzătoare și pot apărea pierderi de nămol. Pentru a remedia acest neajuns, se poate recurge la una sau mai multe din acțiunile enumerate mai jos, în paralel în unitățile de testare și de control:

— se poate adăuga nămol proaspăt sau floclant (de exemplu, 2 ml/vas cu soluție de  $\text{FeCl}_3$  în concentrație de 50 g/l) la intervale regulate, de exemplu zilnic, dar trebuie să se verifice că nu apare o reacție sau o precipitare a substanței chimice testate la contactul cu  $\text{FeCl}_3$ ;

▼ **M4**

- pompa de evacuare cu aer comprimat poate fi înlocuită cu o pompă peristaltică, permițând astfel un debit de recirculare a nămolului aproape egal cu debitul influentului utilizat și permițând dezvoltarea unei zone aerobe în nămolul decantat (geometria pompei de evacuare cu aer comprimat limitează debitul minim al nămolului returnat la circa de 12 ori cel al influentului);
- nămolul poate fi pompat intermitent din separator spre vasul de aerare (de exemplu, timp de 5 minute la fiecare 2,5 h, pentru a recicla între 1 l/h și 1,5 l/h);
- un agent antispumare netoxic, la concentrație minimă, se poate folosi pentru a preveni pierderea prin spumare (de exemplu, ulei silionic);
- aerul poate fi trecut prin nămolul din separator în impulsuri scurte, de șoc (de exemplu, câte 10 secunde la fiecare oră);
- mediul organic poate fi dozat la intervale în vasul de aerare (de exemplu, 3 până la 10 minute la fiecare oră).

*Prelevare de probe și analiză*

44. La intervale regulate se măsoară concentrația de oxigen dizolvat, temperatura și valoarea pH-ului nămolului activ din vasele de aerare. Se asigură că există întotdeauna suficient oxigen ( $> 2$  mg/l) și că temperatura este menținută în intervalul necesar (în mod normal, între 20 și 25 °C). pH-ul se menține la  $7,5 \pm 0,5$  prin dozarea unor cantități mici de bază sau acid anorganic în vasul de aerare sau prin creșterea capacității de tamponare a mediului organic (a se vedea punctul 27). Atunci când apare nitrificarea se produce acid, oxidarea unui miligram de azot producând echivalentul a 7 mg  $\text{CO}_3^-$ . Frecvența de măsurare depinde de parametrul de măsurat și de stabilitatea sistemului și poate varia între măsurători zilnice și săptămânale.
45. Se măsoară COD sau CCO în influenții către vasele de control și de testare. Concentrația de substanță chimică testată în influentul de testare se măsoară prin analiză specifică sau se estimează din concentrația în soluția stoc (punctul 31), volumul utilizat și cantitatea de apă uzată dozată în unitatea de testare. Se recomandă să se calculeze concentrația substanței chimice testate, pentru a reduce variabilitatea datelor privind concentrația.
46. Se prelevează probe corespunzătoare din efluentul colectat (de exemplu, compozit pe 24 h) și se filtrează printr-o membrană cu pori de 0,45  $\mu\text{m}$  sau se centrifughează la circa 40 000  $\text{m/s}^2$  timp de aproximativ 15 minute. Centrifugarea trebuie să fie folosită atunci când filtrarea este dificilă. Se determină COD sau CCO cel puțin de două ori pentru a măsura biodegradarea finală și, dacă este necesar, biodegradarea primară printr-o analiză specifică pentru substanța chimică testată.
47. Folosirea CCO poate duce la probleme de analiză la concentrații scăzute, prin urmare este recomandată doar atunci când se utilizează o concentrație de testare suficient de ridicată (circa 30 mg/l). De asemenea, pentru substanțe chimice cu putere mare de adsorbție, se recomandă măsurarea cantității de substanță chimică adsorbită din nămol cu ajutorul unei tehnici de analiză specifică pentru substanța chimică testată.
48. Frecvența de prelevare a probelor depinde de durata estimată a testului. Frecvența recomandată este de trei ori pe săptămână. După ce unitățile funcționează eficient, se lasă o perioadă de adaptare de una până la șase săptămâni de la introducerea substanței chimice testate, pentru a ajunge la o stare stabilă. Este preferabil să se obțină cel puțin 15 valori valabile în faza de platou (punctul 59), care în mod normal durează trei săptămâni, pentru evaluarea rezultatelor testului. Testul poate fi încheiat atunci când s-a atins un grad suficient de eliminare (de exemplu,  $> 90\%$ ) și când sunt disponibile aceste 15 valori, care reprezintă analizele efectuate în fiecare zi a săptămânii, timp de 3 săptămâni. În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 12 săptămâni de la introducerea substanței chimice testate.



**▼ M4**

49. Dacă nămolul nitrifică și se studiază efectele substanței chimice testate asupra nitrificării, se analizează probe din efluentul din unitățile de testare și control cel puțin o dată pe săptămână, pentru depistarea amoniului și/sau nitritului plus nitratului.
50. Toate analizele trebuie să fie efectuate cât mai devreme posibil, în special determinările azotului. În cazul în care trebuie să se amâne analizele, probele se depozitează la 4 °C, la întuneric, în sticle închise etanș. Atunci când trebuie să se depoziteze probele mai mult de 48 de ore, se conservă prin congelare, acidifiere (de exemplu, 10 mg/l dintr-o soluție de acid sulfuric în concentrație de 400 g/l) sau prin adăugarea unei substanțe toxice adecvate [de exemplu, 20 ml/l dintr-o soluție de clorură de mercur (II) în concentrație de 10 g/l]. Se asigură că tehnica de conservare nu influențează rezultatul analizei.

*Cuplarea unităților de testare*

51. Atunci când se folosește cuplarea (apendicele 3), se schimbă zilnic aceeași cantitate de nămol activ (între 150 ml și 1 500 ml pentru vase de aerare care conțin 3 litri de soluție apoasă) între vasele de aerare ale unității de testare și cele ale unității de control. În cazul în care substanța chimică testată adsorbe puternic pe nămol, se schimbă doar supernatantul separatoarelor. În ambele cazuri se folosește un factor de corecție pentru calculul rezultatelor testului (punctul 55).

**DATE ȘI RAPORT****Interpretarea rezultatelor**

52. Se calculează procentul de eliminare a COD sau CCO din substanța chimică testată, pentru fiecare evaluare într-un interval de timp, cu ecuația:

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

unde:

$D_t$  = % eliminare COD sau CCO la momentul  $t$

$C_s$  = COD sau CCO în influent, datorită substanței chimice testate, de preferință estimată din soluția stoc (mg/l)

$E$  = valoarea COD sau CCO măsurată în efluentul de testare la momentul  $t$  (mg/l)

$E_o$  = valoarea COD sau CCO măsurată în efluentul de control la momentul  $t$  (mg/l)

53. Gradul de eliminare a COD sau CCO din mediul organic în unitatea de testare este o informație utilă pentru evaluarea activității de biodegradare a nămolului activ în timpul testului. Se calculează procentul de eliminare cu ecuația:

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

unde:

$D_B$  = % eliminare COD sau CCO în mediul organic în unitatea de control la momentul  $t$

$C_M$  = COD sau CCO în mediul organic în influentul de control (mg/l)



**▼ M4**

Optional, se calculează procentul de eliminare a COD sau CCO datorat mediului organic plus substanței chimice testate în unitatea de testare cu ecuația:

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

unde:

$D_T$  = % eliminare COD sau CCO în totalul influentului de testare

$C_T$  = COD sau CCO în totalul influentului de testare sau calculat din soluțiile stoc (mg/l)

54. Se calculează eliminarea substanței chimice testate dacă este măsurată cu o metodă analitică specifică la fiecare evaluare temporală, cu ecuația:

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

unde:

$D_{ST}$  = % eliminare primară a substanței chimice testate la momentul  $t$

$S_i$  = concentrația de substanță chimică, măsurată sau estimată în influentul de testare (mg/l)

$S_e$  = concentrația de substanță chimică testată, măsurată sau estimată în efluentul de testare la momentul  $t$  (mg/l)

55. În cazul în care s-a folosit modul de cuplare, diluția substanței chimice testate în vasul de aerare la schimbul de nămol se compensează cu ajutorul unui factor de corecție (a se vedea apendicele 3). Dacă s-au utilizat un timp de retenție hidraulică mediu de 6 ore și un schimb de jumătate din volumul de nămol activ în vasul de aerare, valorile de eliminare zilnică determinate ( $D_t$ , punctul 52) trebuie să fie corectate pentru a obține gradul de eliminare real,  $D_{tc}$  al substanței chimice testate, cu ecuația:

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

#### **Exprimarea rezultatelor testului**

56. Se face graficul eliminării procentuale  $D_t$  (sau  $D_{tc}$ ) și  $D_{st}$ , dacă este disponibil, în funcție de timp (a se vedea apendicele 2). Din forma curbei de eliminare a substanței chimice testate (în sine sau ca COD) se pot trage unele concluzii despre procesul de eliminare.

#### *Adsorbție*

57. Dacă de la începutul testului se observă un nivel ridicat de eliminare a COD din substanța chimică testată, probabil că substanța chimică testată este eliminată prin adsorbție pe materiile solide din nămolul activ. Acest lucru se poate dovedi prin determinarea substanței chimice testate adsorbite, prin analize specifice. Nu este uzual ca nivelul de eliminare a COD din substanțele chimice adsorbabile să rămână ridicat pe toată durata testului; în mod normal, eliminarea este mai pronunțată la început, iar apoi scade treptat până la o valoare de echilibru. Totuși, dacă substanța chimică testată adsorbabilă a putut duce la aclimatizarea populației microbiene într-un fel sau altul, gradul de eliminare a COD din substanța chimică testată ar urma să crească ulterior, ajungând la o valoare de platou ridicată.

▼ **M4***Fază de latență*

58. La fel ca în cazul testelor statice de screening, pentru multe substanțe chimice testate este nevoie de o fază de latență înainte de apariția biodegradării totale. În faza de latență, aclimatizarea sau adaptarea bacteriilor de degradare are loc aproape fără nicio eliminare din substanța chimică testată; apoi apare creșterea inițială a acestor bacterii. Această fază se încheie, iar faza de degradare se consideră că începe atunci când este înlăturată circa 10 % din cantitatea totală de substanță chimică testată (după ce se lasă timp pentru adsorbție, dacă apare). Faza de latență este adesea foarte variabilă și slab reproductibilă.

*Fază de platou*

59. Faza de platou a unei curbe de eliminare dintr-un test continuu este definită ca fiind faza în care are loc degradarea maximă. Faza de platou trebuie să fie de cel puțin 3 săptămâni și să conțină circa 15 valori măsurate valabile.

*Grad mediu de eliminare a substanței chimice testate*

60. Se calculează valoarea medie din valorile de eliminare ( $D_t$ ) ale substanței chimice testate în faza de platou. Rotunjit la cel mai apropiat număr întreg (1 %), reprezintă gradul de eliminare a substanței chimice testate. De asemenea, se recomandă calcularea intervalului de încredere de 95 % pentru valoarea medie.

*Eliminare din mediul organic*

61. Se face graficul eliminării de COD sau CCO din mediul organic în unitatea de control ( $D_B$ ) funcție de timp. Se indică gradul minim de eliminare în același mod ca și pentru substanța chimică testată (punctul 60).

*Indicarea biodegradării*

62. Dacă substanța chimică testată nu adsoarbe în mod semnificativ pe nămolul activ și curba de eliminare are forma tipică a unei curbe de biodegradare cu faze de latență, degradare și platou (punctele 58, 59), eliminarea măsurată poate fi atribuită fără ezitare biodegradării. Dacă are loc o înlăturare inițială ridicată, testul de simulare nu poate face diferența între procesele de eliminare biologică și abiotică. În asemenea cazuri, precum și în alte cazuri în care există dubii privind biodegradarea (de exemplu, dacă are loc procesul de stripping), se analizează substanțele chimice testate adsorbite sau se efectuează teste de biodegradare statică suplimentare, pe baza parametrilor care indică în mod clar procese biologice. Astfel de teste sunt metodele de absorbție a oxigenului [capitolul C.4 D, E și F din prezenta anexă (6)] sau un test cu măsurarea producției de dioxid de carbon [capitolul C.4 C din prezenta anexă (6)] sau metoda ISO Headspace (18), folosind un inocul preexpus, din testul de simulare. Dacă s-au măsurat atât eliminarea COD, cât și eliminarea substanței chimice specifice, diferențele semnificative (prima fiind mai scăzută decât a doua) dintre procente eliminate indică prezența de produse organice intermediare în efluenți, care pot fi mai dificil de degradat decât substanța chimică inițială.

*Validarea rezultatelor testelor*

63. Informații despre comportamentul normal de biodegradare a inoculului se obțin dacă se determină gradul de eliminare din mediul organic (punctul 53) în unitatea de control. Testul este considerat valabil dacă gradul de eliminare a COD sau CCO în unitatea (unitățile) de control este > 80 % după două săptămâni și nu s-au înregistrat observații neobișnuite.

**▼ M4**

64. Dacă s-a utilizat o substanță chimică (de referință) ușor biodegradabilă, gradul de biodegradare ( $D_t$ , punctul 52) trebuie să fie  $> 90 \%$ .
65. Atunci când testul este efectuat în condiții de nitrificare, concentrația medie în efluenți trebuie să fie  $< 1 \text{ mg/l}$  de azot amoniacal și  $< 2 \text{ mg/l}$  de azot nitric.
66. Dacă aceste criterii (punctele 63-65) nu sunt îndeplinite, se repetă testul folosind un inocul dintr-o sursă diferită, se testează o substanță chimică de referință și se revizuiesc toate procedurile experimentale.

**Raport de testare**

67. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică testată:*

- date de identificare;
- natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice.

*Condițiile de testare:*

- tipul sistemului de testare; orice modificări pentru testarea substanțelor chimice insolubile și volatile;
- tipul mediului organic;
- proporția și natura apelor reziduale industriale prezente în apele uzate, dacă se cunosc;
- inoculul, natura și locul (locurile) de prelevare a probelor, concentrația și orice tratare preliminară;
- soluția stoc de substanță chimică testată: conținutul de COD și COT; modul de preparare, dacă este în suspensie; concentrația de testare utilizată; motivele, dacă COD nu se încadrează în limitele 10-20 mg/l; metoda de adăugare; data primei adăugări; orice schimbări;
- vârsta medie a nămolului și timpul mediu de retenție hidraulică; metoda de înlăturare a surplusului de nămol; metode de prevenire a aglomerării, pierderii de nămol etc.;
- tehnici de analiză utilizate;
- temperatura de testare;
- calitățile aglomeratelor de nămol, indexul de volum al nămolului (IVN), materiile solide în suspensie în soluția apoasă mixtă (MSSAM);
- orice deviație de la procedurile standard și orice circumstanțe care ar fi putut afecta rezultatele.

*Rezultatele testului:*

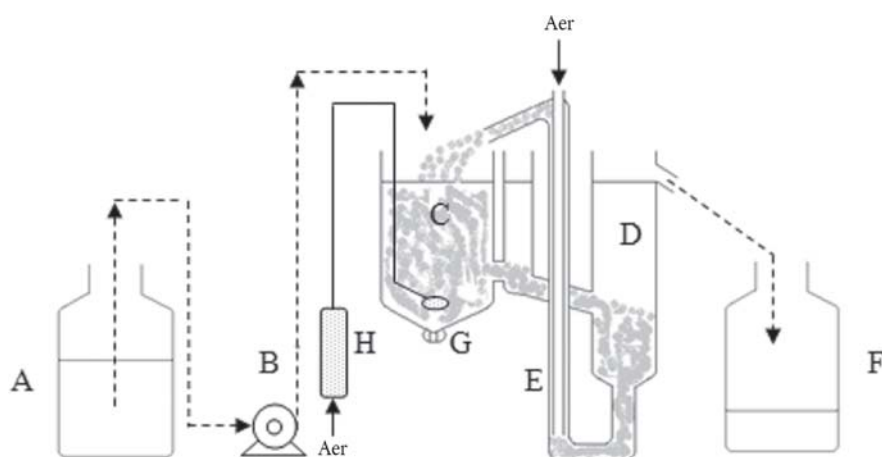
- toate datele măsurate (COD, CCO, analize specifice, pH, temperatură, concentrație de oxigen, materii solide în suspensie, substanțe azotoase, dacă sunt relevante);
- toate valorile calculate ale  $D_t$  (sau  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$  obținute în formă tabelară și curbele de eliminare;
- informații privind fazele de latență și platou, durata de testare, gradul de eliminare a substanței chimice testate și a mediului organic în unitatea de control, împreună cu informații statistice și specificații privind biodegradabilitatea și valabilitatea testului;
- discutarea rezultatelor.

▼ **M4***BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Swisher R.D. (1987), „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc., New York, 1085 pp.
- (2) German Government (1962), Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents, Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
- (3) Painter H.A. and King E.F. (1978a), WRC porous-pot method for assessing biodegradability, Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- (4) Painter H.A. and King E.F. (1978b), The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants, Wat. Res. 12: 909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.
- (6) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» ”.
- (7) Capitolul C.12 din prezenta anexă, „Biodegradare – Testul SCAS modificat”.
- (8) Capitolul C.19 din prezenta anexă, „Estimarea coeficientului de adsorbție ( $K_{CO}$ ) pe sol și nămol de epurare cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC)”.
- (9) Gerike P. și Fischer W.K. (1979), A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
- (10) Gerike P. și Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions, Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
- (11) Painter H.A. and Bealing D. (1989), Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp. 113-138. În: Laboratory tests for simulation of water treatment processes, CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (12) ISO 11733 (1995; revizuit 2004), Calitatea apei. Determinarea eliminării și a biodegradabilității compușilor organici în mediu apos. Test de simulare cu nămol activ.
- (13) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
- (14) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
- (15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test, Wat.Res. 14: 753-758.
- (16) Baumann U., Kuhn G. și Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 10: 214-220.
- (17) Her Majesty's Stationery Office (1982), Assessment of biodegradability, Methods for the examination of waters and associated materials, pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (18) ISO 14593 (1998), Calitatea apei. Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetic (încercare cu CO<sub>2</sub> în spațiul superior).

▼ **M4***Apendicele 1**Figura 1***Echipament utilizat pentru evaluarea biodegradabilității**

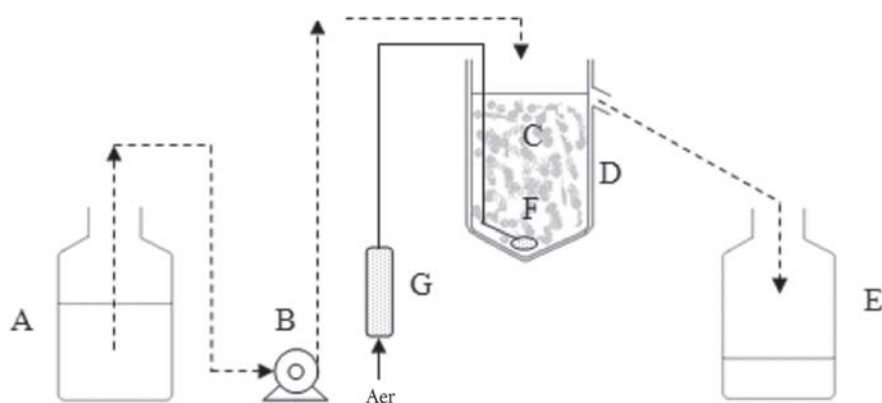
Unitate Husmann



- |                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| A. Vas de alimentare              | E. Pompă de evacuare cu aer comprimat |
| B. Pompă de dozare                | F. Vas de colectare                   |
| C. Vas de aerare (capacitate 3 l) | G. Aerator                            |
| D. Vas de decantare               | H. Contor debit de aer                |

*Figura 2***Echipament utilizat pentru evaluarea biodegradabilității**

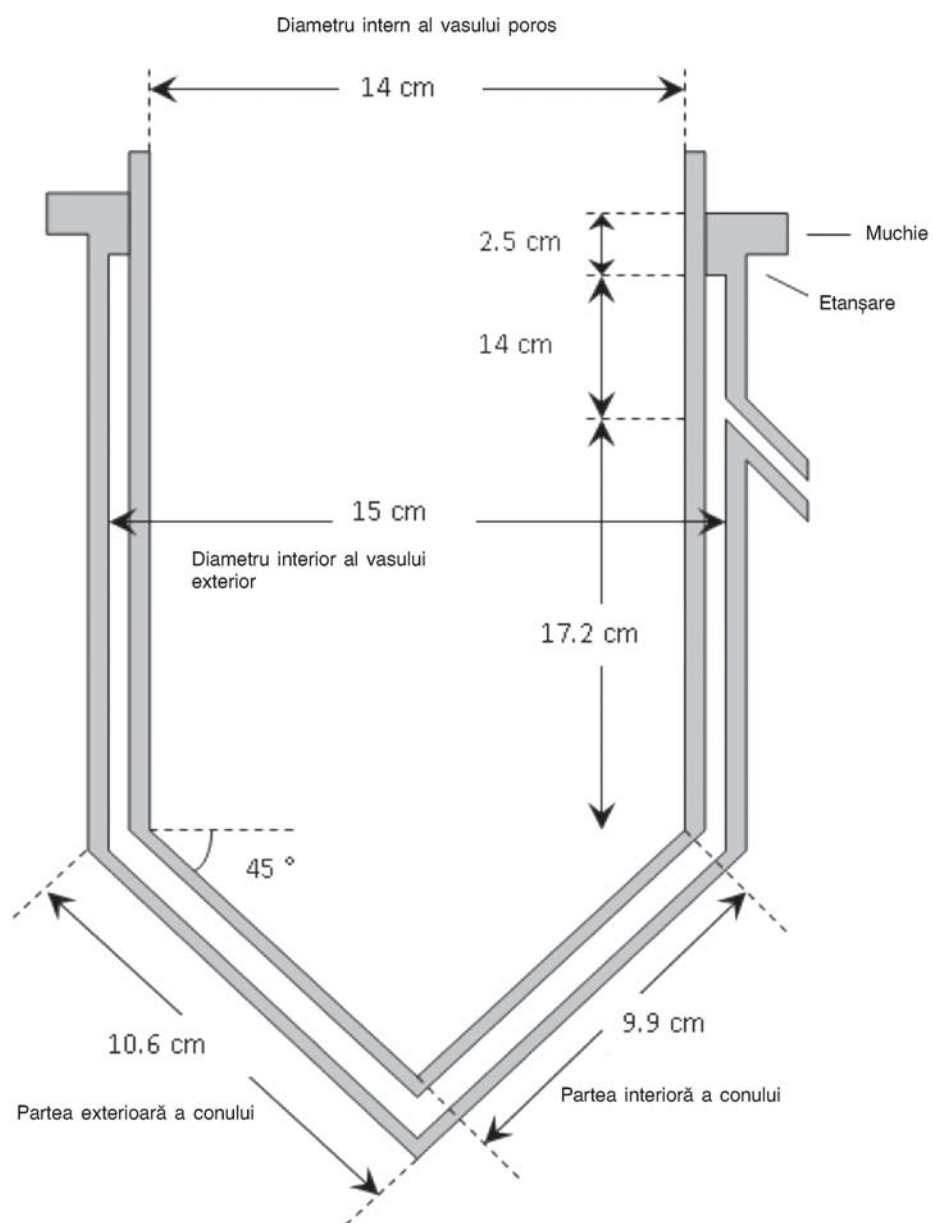
Vas poros

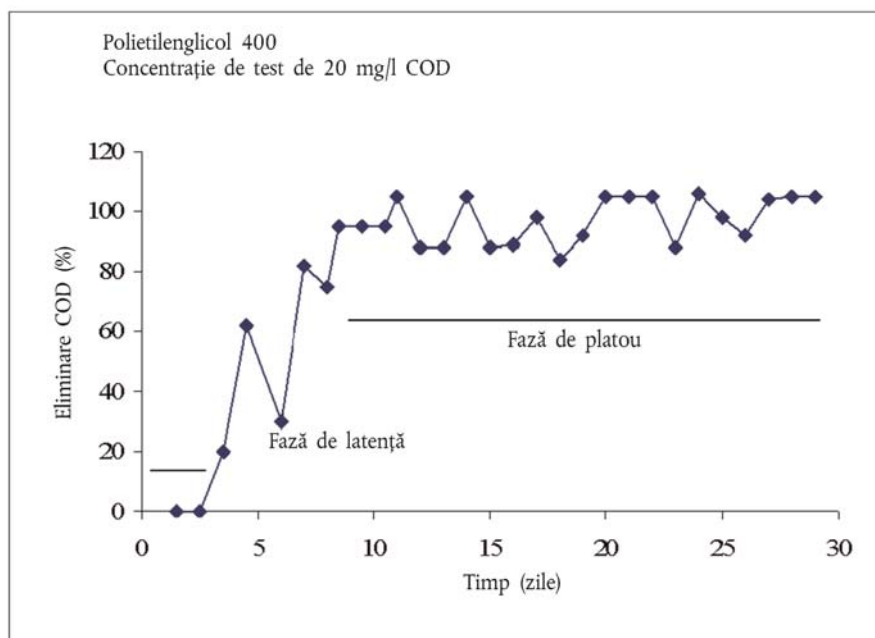


- |                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| A. Vas de alimentare        | E. Vas de colectare    |
| B. Pompă dozatoare          | F. Difuzor             |
| C. Vas poros de aerare      | G. Contor debit de aer |
| D. Vas exterior impermeabil |                        |

▼ **M4**

Figura 3

**Detalii ale vasului poros de aerare de 3 litri**

▼ **M4***Apendicele 2**Exemplu de curbă de eliminare*

▼ **M4***Apendicele 3*

[INFORMATIV]

## CUPLAREA UNITĂȚILOR DE TESTARE

Pentru a încerca egalizarea populațiilor microbiene în nămolurile din unitatea de testare, care primește ape uzate plus o substanță chimică testată, și din unitatea de control, care primește doar ape uzate, s-a introdus schimbul reciproc de nămol (1). Procedura s-a numit cuplare, iar metoda este cunoscută sub numele de regim cu instalații cuplate. Inițial, cuplarea s-a realizat cu ajutorul unităților Husmann cu nămol activ, dar ea s-a făcut și cu unități de tip vas poros (2) (3). Nu s-au constatat diferențe semnificative între rezultatele obținute cu unități necuplate și cu unități cuplate, fie de tip Husmann, fie de tip vas poros, deci nu este avantajos să se dedice mai mult timp și energie pentru cuplarea unităților.

Schimburile de nămol pot apărea ca o înlăturare destul de considerabilă, întrucât unele din substanțele chimice testate sunt transferate, iar concentrațiile de substanță chimică testată din efluenții de testare și de control se apropie mai mult de egalitate. Astfel, trebuie să se folosească factori de corecție, care depind de fracțiunea schimbată și de timpul mediu de retenție hidraulică. S-au publicat mai multe detalii privind acest calcul (1).

Se calculează gradul de eliminare a COD sau CCO corectat, cu ajutorul formulei generale:

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

unde:

$D_{tc}$  = % corectat de eliminare a COD sau CCO

$D_t$  = % determinat de eliminare a COD sau CCO

$a$  = fracțiunea de schimb a volumului unităților de nămol activ

$r$  = timpul mediu de retenție hidraulică (h)

Dacă, de exemplu, jumătate din volumul din vasul de aerare este schimbat ( $a = 0,5$ ), iar timpul mediu de retenție hidraulică este de 6 h, formula de corecție este:

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

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975), Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989), Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. În: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter H.A., King E.F. (1978), Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.



▼ **M4***Apendicele 4***EVALUAREA INHIBIȚIEI NĂMOLULUI ACTIV****Proces în funcție de substanțele chimice testate**

1. O substanță chimică (sau o apă uzată) poate să nu fie degradată sau înlăturată în testul de simulare și poate avea chiar un efect inhibitor asupra microorganismelor din nămol. Alte substanțe chimice sunt biodegradate la concentrații scăzute, dar sunt inhibitoare la concentrație mai mare (hormeză). Este posibil ca efectele inhibitoare să fi fost relevate într-un stadiu mai incipient sau ele pot fi determinate prin aplicarea unui test de toxicitate, cu ajutorul unui inocul similar sau identic cu cel folosit în testul de simulare (1). Astfel de metode sunt inhibarea absorbției de oxigen [capitolul C.11 din prezenta anexă (2) și ISO 8192 (3)] sau inhibarea creșterii organismelor din nămol [ISO 15522 (4)].
2. În testul de simulare, orice inhibiție se va manifesta prin faptul că diferența de carbon organic dizolvat (COD) sau consum chimic de oxigen CCO între efluentul din vasul de testare și cel din vasul de control este mai mare decât COD adăugat ca substanță chimică testată. Exprimat în alt mod, înlăturarea procentuală a COD (și consumul biochimic de oxigen CBO, consumul chimic de oxigen CCO și/sau  $\text{NH}_4^+$ ) din mediul organic tratat va scădea în prezența substanței chimice testate. Dacă se întâmplă acest lucru, testul trebuie să fie repetat, reducând concentrația substanței chimice testate până ce se atinge un nivel la care nu apare inhibiția și eventual se reduce concentrația în continuare până ce substanța chimică testată este biodegradată. Totuși, dacă substanța chimică testată (sau apa uzată) are efecte adverse asupra procesului la toate concentrațiile testate, sunt indicii că este dificil, dacă nu chiar imposibil, ca substanța chimică să fie tratată biologic, dar poate ar merita să se repete testul cu nămol activ dintr-o altă sursă și/sau nămolul să fie supus unei aclimatizări mai treptate.
3. Dimpotrivă, atunci când substanța chimică testată este bioeliminată la prima încercare în testul de simulare, concentrația sa trebuie să fie crescută în cazul în care trebuie să se cunoască dacă substanța chimică ar putea fi inhibitoare.
4. La determinarea gradelor de inhibiție, trebuie să se rețină faptul că populația din nămolul activ se poate schimba, astfel încât în timp microorganismele pot dezvolta o toleranță față de substanța chimică inhibitoare.
5. Calculul gradului de inhibiție:

Procentele generale de înlăturare  $R_o$  a CBO, COD, CCO etc. pentru unitățile de testare și de control se pot calcula cu formula:

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

unde:

$I$  = concentrația în influent a CBO, COD, CCO etc. pentru vasele de testare sau de control (mg/l)

$E$  = concentrațiile respective în efluent (mg/l)

$I$  și  $E$  trebuie să fie corectate ținând seama de COD datorate substanței chimice testate din unitățile de testare, altfel calculele inhibiției procentuale vor fi incorecte.

**▼M4**

Gradul de inhibiție produs de prezența substanței chimice testate se poate calcula cu formula:

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

unde:

$R_c$  = înlăturare procentuală în vasele de control

$R_t$  = înlăturare procentuală în vasele de testare

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Reynolds L. *et al.* (1987), Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability, *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Capitolul C.11 din prezenta anexă, „Biodegradare – Nămolul activ: Test de inhibiție a respirației”.
- (3) ISO 8192 (2007) Calitatea apei – Test de inhibiție a consumului de oxigen al nămolului activ la oxidarea carbonului și amoniului.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼ **M4***Apendicele 5***Substanțe chimice testate puțin solubile în apă – substanțe chimice volatile****Substanțe chimice puțin solubile în apă**

Se pare să s-au publicat puține rapoarte privind substanțele chimice puțin solubile și insolubile în apă supuse la teste care simulează tratarea apelor uzate (1) (2) (3).

Nu există o metodă unică de dispersie a substanței chimice testate care să poată fi aplicată la toate substanțele chimice insolubile. Două din cele patru tipuri de metode descrise în ISO 10634 (4) par potrivite pentru încercarea de a dispersa substanțele chimice testate pentru testul de simulare; este vorba despre utilizarea agenților de emulsifiere și/sau a energiei ultrasonice. Trebuie să se determine stabilitatea dispersiei rezultate, pe perioade de cel puțin 24 de ore. Apoi, dispersiile stabilizate corespunzător, conținute într-un rezervor cu amestecare continuă (punctul 38), trebuie să fie adăugate într-un vas de aerare, separat de apele uzate menajere (sau sintetice).

Dacă dispersiile sunt stabile, se analizează modul în care substanța chimică testată se poate determina în formă dispersată. Este puțin probabil ca COD să fie adecvat, astfel încât trebuie să se stabilească o metodă analitică specifică, ce poate fi aplicată efluenților, substanțelor solide din efluenți și nămolului activ. Evoluția substanței chimice testate în simularea procesului cu nămol activ se determină apoi în fazele lichidă și solidă. Astfel, se stabilește un „bilanț masic” pentru a decide dacă substanța chimică testată a fost biodegradată. Totuși, aceasta ar indica doar biodegradarea primară. Demonstrarea biodegradării finale trebuie să fie încercată prin aplicarea unui test respirometric pentru biodegradabilitate rapidă [capitolul C.4 din prezenta anexă (5) C, F sau D], utilizând ca inocul nămol expus substanței chimice testate în testul de simulare.

**Substanțe chimice volatile**

Aplicarea simulărilor privind tratarea apelor uzate la substanțe chimice volatile este în egală măsură discutabilă și problematică. La fel ca în cazul substanțelor chimice testate puțin solubile în apă, s-au publicat foarte puține rapoarte care descriu testele de simulare cu substanțe chimice volatile. Un tip convențional de aparat de amestecare completă este adaptat prin etanșarea vaselor de aerare și decantare, măsurarea și controlul fluxului de aer cu ajutorul unor debitmetre și trecerea gazului evacuat prin separatoare, pentru a colecta materiile organice volatile. În unele cazuri se folosește o pompă de vid pentru extragerea gazului evacuat printr-un separator „rece” sau un separator de purjare care conține Tenax și silicagel pentru analize de cromatografie în fază gazoasă. Substanța chimică testată prezentă în separator poate fi determinată prin metodă analitică.

Testul se efectuează în două etape. Mai întâi, unitățile funcționează fără nămol, dar cu apă uzată sintetică plus substanța chimică testată care este pompată în vasul de aerare. Se prelevează probe din influent, efluent și gazul evacuat, care sunt analizate timp de câteva zile pentru determinarea substanței chimice testate. Din datele colectate, se poate calcula procentul ( $R_{vs}$ ) din substanța chimică testată eliminată din sistem.

Apoi se efectuează testul biologic (cu nămol), în condiții de funcționare identice cu cele din studiul privind striparea. Măsurătorile privind COD sau CCO se fac și pentru a verifica dacă unitățile funcționează eficient. Ocazional, se fac analize pentru a determina substanța chimică testată din influent, efluent și gazul evacuat în prima parte a testului; după aclimatizare se fac analize mai frecvente. Din nou, din datele în starea stabilă, se poate calcula procentul de înlăturare a substanței chimice testate din faza lichidă pentru toate procesele ( $R_T$ ) (fizic și biologic), precum și proporția ( $R_V$ ) eliminată din sistem.

**▼ M4**

Calcul:

- (a) în testul nebiologic, procentul ( $R_{VP}$ ) de material de testare eliminat din sistem se poate calcula cu formula:

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

unde:

$R_{VP}$  = înlăturarea substanței chimice testate prin volatilizare (%)

$S_{VP}$  = substanța chimică testată colectată în separator, exprimată ca și concentrație echivalentă în faza lichidă (mg/l)

$S_{IP}$  = concentrația de substanță chimică testată în influent (mg/l);

- (b) în testul biologic, procentul ( $R_V$ ) de material de testare eliminat din sistem se poate calcula cu formula:

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

unde:

$R_V$  = înlăturarea substanței chimice testate prin volatilizare în testul biologic (%)

$S_V$  = substanța chimică testată colectată în separator în testul biologic, exprimată ca și concentrație echivalentă în influentul lichid (mg/l)

$S_I$  = concentrația de substanță chimică testată în influent (mg/l);

- (c) în testul biologic, procentul ( $R_T$ ) din substanța chimică testată înlăturată prin toate procesele este calculat cu formula:

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

unde:

$S_E$  = concentrația de substanță chimică testată în efluent (lichid) (mg/l);

- (d) astfel, procentul ( $R_{BA}$ ) înlăturat prin biodegradare plus adsorbție se poate calcula astfel:

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

Trebuie să se facă teste separate, pentru a determina dacă substanța chimică testată este adsorbită; dacă da, atunci se poate face o corecție ulterioară;

- (e) o comparație între proporția de substanță chimică testată înlăturată din sistemele de testare biologică ( $R_V$ ) și nebiologică ( $R_{VP}$ ) indică efectul general al tratării biologice asupra emisiei de substanță chimică testată în atmosferă.

*Exemplu:* Benzen

Timp de retenție a nămolului = 4 zile

Apă uzată sintetică; timp de retenție = 8 ore

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

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

$S_V = 22,5$  mg/l

$S_E = 50$  µg/l

**▼M4**

Astfel,

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

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

S-a presupus că benzenul nu este adsorbit în nămol.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970), Biological degradation of tertiary butyl alcohol, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939854.
- (2) Pitter P., Chudoba J. (1990), Biodegradability of organic substances in the aquatic environment, CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983), Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters, J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Calitatea apei. Ghid pentru pregătirea și tratarea compușilor organici greu solubili în apă în vederea evaluării biodegradabilității lor în mediu apos.
- (5) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide»”.

▼ **M4***Apendicele 6***Efectele timpului de retenție a nămolului (TRN) asupra tratabilității substanțelor chimice****INTRODUCERE**

1. Metoda descrisă în textul principal a fost concepută pentru a verifica dacă substanțele chimice testate (de obicei cele cunoscute ca fiind inerent, dar nu ușor, biodegradabile) pot fi biodegradate în limitele impuse în cadrul stațiilor de epurare a apelor uzate. Rezultatele sunt exprimate ca procent de înlăturare și procent de biodegradare. Condițiile de exploatare a unităților cu nămol activ și alegerea influentului permit variații destul de mari ale concentrației substanței chimice testate în efluent. Testele sunt efectuate doar la o singură concentrație nominală de substanțe solide în nămol sau la un timp nominal de retenție a nămolului (TRN), iar regimurile de înlăturare a surplusului de nămol descrise pot face ca valoarea TRN să varieze considerabil în timpul testului, atât de la o zi la alta, cât și pe durata unei zile.
2. În această variantă (1) (2), TRN este controlat în limite mult mai restrânse pe fiecare perioadă de 24 de ore (la fel cum se întâmplă și pe scară largă), ceea ce conduce la o concentrație mai puțin variabilă în efluenți. Se recomandă apa uzată menajeră, întrucât conduce la procente de înlăturare mai mari și mai consecvente. De asemenea, sunt analizate efectele unei serii de valori ale TRN, iar în cadrul unui studiu mai detaliat se pot determina efectele unui interval de temperaturi asupra concentrației efluentului.
3. Încă nu s-a ajuns la un consens general privind modelele cinetice care trebuie să fie utilizate în cazul degradării substanțelor chimice în condițiile tratării apelor uzate. S-a utilizat modelul Monod de creștere bacteriană și utilizare a substratului (1) (2), pentru a fi aplicat la datele colectate, întrucât metoda a fost concepută pentru a fi aplicată doar la substanțele chimice produse în cantități mari, ducând la concentrații de peste 1 mg/l în apele uzate. Valabilitatea modelului simplificat și ipotezele adoptate au fost stabilite cu ajutorul unei serii de alcooli etoxilați cu diverse grade de biodegradabilitate primară (2) (3).

*Notă:* Această variantă de metodă respectă în mare măsură textul metodei de testare din C.10-A, prin urmare în continuare se indică mai jos doar detaliile care diferă.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

4. Unitățile de tip vas poros cu nămol activ, concepute pentru a facilita înlăturarea (aproape) continuă de soluții apoase mixte care permit un control foarte precis al timpului de retenție a nămolului (TRN sau  $\theta_r$ ), sunt exploatate în regim de instalații necuplate, într-un interval de TRN și – opțional – într-un interval de temperaturi. De obicei, timpul de retenție este cuprins între 2 și 10 zile, iar temperatura între 5 și 20 °C. Apa uzată, de preferință menajeră, și o soluție din substanța chimică testată sunt dozate separat în unități, în ritmul necesar pentru a obține timpul necesar de retenție în apele uzate (3 până la 6 ore) și concentrația necesară a substanței chimice testate în influent. Unitățile de control care nu primesc substanța chimică testată sunt exploatate în paralel, în scop comparativ.
5. Se pot utiliza și alte tipuri de aparate, dar trebuie să se acorde mare atenție pentru asigurarea unui control corespunzător asupra TRN. De exemplu, atunci când se utilizează instalații cu decantor integrat ar putea fi necesar să se ia în considerare pierderea de substanțe solide prin efluentul instalației. În plus, trebuie să se ia măsuri speciale de precauție pentru a evita erorile datorate variației cantității de nămol în decantor.

**▼ M4**

6. Unitățile sunt exploatate la fiecare set de condiții selectat și, după ce s-a atins un echilibru, sunt obținute concentrațiile medii în stare stabilă în efluentul substanței chimice testate și, opțional, COD, pe o perioadă de circa trei săptămâni. În afară de evaluarea procentului de înlăturare a substanței chimice testate și, opțional, a COD, relația dintre condițiile de funcționare în instalație și concentrația în efluent este exprimată în formă grafică. De aici se pot calcula constantele cinetice experimentale și se pot prevedea condițiile în care poate fi tratată substanța chimică testată.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ**

7. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 12 și 13.

**NIVELURI DE TRECERE**

8. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 14 și 15.

**SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

9. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 16.

**REPRODUCIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII**

10. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 17 și 18.

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură**

11. O unitate adecvată este sistemul cu vas poros modificat (apendicele 6.1). El constă într-un vas interior (sau căptușeală) construit din polipropilenă poroasă de 3,2 mm grosime și cu pori de circa 90 μm diametru, ansamblul fiind sudat în partea inferioară. (Prin această metodă se obține o unitate mai robustă decât cea descrisă la punctul 21 din prezentul capitol C.10 A). Căptușeala este montată într-un vas exterior impermeabil, din polietilenă, format din două părți: o bază circulară în care sunt făcute găuri pentru a permite montarea a două furtunuri de aer și a unui furtun de înlăturare a surplusului de nămol și un cilindru superior care se înșurubează de baza circulară și care are un orificiu de evacuare plasat astfel încât în vasul poros să se obțină un volum cunoscut (3 l). Unul din furtunurile de aer este echipat cu o piatră de difuzare, iar celălalt este deschis la capăt și montat în unghi drept la piatra din vas. Acest sistem produce turbulența necesară pentru a asigura amestecarea completă a conținutului vasului, precum și pentru a obține concentrații de oxigen dizolvat mai mari de 2 mg/l.
12. Numărul corespunzător de unități este menținut la temperaturi controlate în intervalul de la 5 până la 20 °C ( $\pm 1$  °C), fie în bazine cu apă, fie în încăperi cu temperatură constantă. Este nevoie de pompe pentru a doza alimentarea vaselor de aerare cu soluția de substanță chimică testată și cu apă uzată decantată la debitele cerute (0-1,0 ml/min, respectiv 0-25 ml/min) și de o a treia pompă pentru a înlătura nămolul rezidual din vasele de aerare. Debitul de curgere foarte scăzut necesar pentru nămolul rezidual este obținut prin utilizarea unei pompe reglate la un debit mai mare și care funcționează intermitent, cu ajutorul unui temporizator, de exemplu timp de 10 secunde pe minut, un debit de pompare de 3 ml/min conducând la o rată de pierdere a surplusului de nămol de 0,5 ml/min.

***Aparat de filtrare sau centrifugă***

13. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 23.

***Echipamente pentru analiză***

14. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 24.

***Apă***

**▼M4**

15. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 25 și 26.

*Mediu organic*

16. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 27.

*Apă uzată sintetică*

17. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 28.

*Apă uzată menajeră*

18. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 29.

*Nămol activ*

19. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 30.

*Soluții stoc de substanță chimică testată*

20. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 31 și 32.

**PROCEDURĂ***Prepararea inoculului*

21. Sunt valabile doar informațiile din capitolul C.10-A, punctul 34 – se folosește nămol activ (circa 2,5 g/l).

*Număr de unități de testare*

22. Pentru un test simplu, adică de măsurare a procentului de înlăturare, este nevoie de un singur TRN, dar pentru obținerea datelor necesare pentru calculul constantelor cinetice experimentale sunt necesare 4 sau 5 valori. De obicei, se aleg valori cuprinse între 2 și 10 zile. Practic, este convenabil să se facă un test la 4 sau 5 TRN simultan, la o singură temperatură; în studiile extinse, aceleași valori ale TRN sau poate o gamă de valori diferite se utilizează la alte temperaturi în intervalul 5-20 °C. Pentru biodegradarea primară (utilizarea principală), în mod normal este nevoie doar de o singură unitate pentru fiecare set de condiții. Totuși, pentru biodegradabilitatea finală este nevoie, pentru fiecare set de condiții, de o unitate de control care primește apă uzată, dar nu substanță chimică testată. Atunci când se crede că substanța chimică testată este prezentă în apa uzată utilizată, trebuie să se folosească unități de control la evaluarea biodegradării primare și să se facă toate corecțiile necesare în calcule.

*Dozarea mediului organic și a substanței chimice testate*

23. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 36-39, dar trebuie notat faptul că soluția de substanță chimică testată este dozată separat și că se folosesc diverse rate de pierdere a surplusului de nămol. De asemenea, se monitorizează și, dacă este necesar, se ajustează frecvent, de exemplu de două ori pe zi, la circa  $\pm 10\%$ , debitele de curgere a influențelor, efluenților și surplusului de nămol. În cazul în care apar dificultăți în metodele analitice la utilizarea apei uzate menajere, testul se efectuează cu apă uzată sintetică, dar trebuie să se asigure că mediile diferite duc la obținerea unor date cinetice comparabile.

*Manipularea unităților cu nămol activ*

24. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 40 și 43, dar TRN se controlează doar pentru pierderea „constantă” a nămolului.

*Prelevare de probe și analiză*

25. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 44 și 50, cu excepția faptului că este opțională determinarea concentrației de substanță chimică testată și COD; nu trebuie să se utilizeze CCO.



**▼M4****DATE ȘI RAPORT****Interpretarea rezultatelor**

26. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 52-54.

**Exprimarea rezultatelor testului**

27. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 56-62.

**Calculul constantelor cinetice**

28. Este mai realist să se menționeze concentrația medie în stare stabilă a substanței chimice testate în efluent și să se descrie modul în care aceasta variază în funcție de condițiile de funcționare în instalație, decât să se menționeze biodegradarea primară procentuală. Aceasta se poate face prin considerarea ecuației 6 din apendicele 6.2, cu care se pot obține valori pentru  $K_s$ ,  $\mu_m$  și  $\theta_{SC}$ , timpul critic de retenție a nămolului.

[Ca alternativă, se pot obține valori aproximative de  $K_s$  și  $\mu_m$  cu ajutorul unui program de calculator simplu, pentru a potrivi curba teoretică rezultată din ecuația 2 (apendicele 6.2) cu valorile experimentale obținute. Cu toate că nicio substanță nu este unică, se poate obține o aproximare rezonabilă a  $K_s$  și  $\mu_m$ .]

**Variabilitatea rezultatelor**

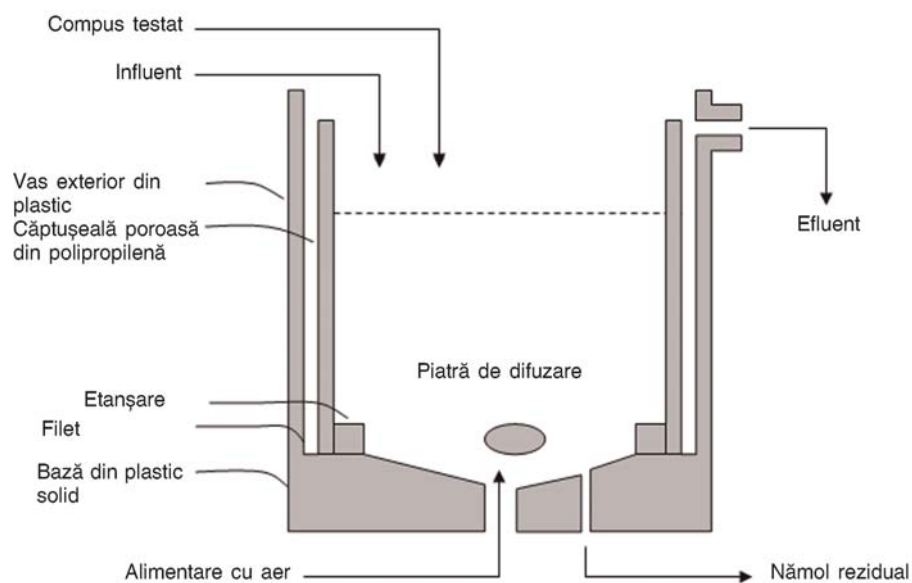
29. S-a observat experimental că pentru substanțe chimice individuale se obțin valori variabile ale parametrilor cinetici. Se consideră că valorile rezultate sunt influențate în mare măsură de condițiile de creștere a nămolului, precum și de condițiile preponderente în testul utilizat (ca la punctul 5 și în alte teste). Un aspect al acestei variabilități a fost discutat de Grady *et al.* (4), care au sugerat că termenii „extant” și „intrinsec” ar trebui să fie aplicați la două condiții extreme care reprezintă limitele stării fiziologice pe care o poate atinge o cultură în timpul unui experiment cinetic. Atunci când nu este permisă schimbarea stării în timpul testului, valorile parametrului cinetic reflectă condițiile din mediul din care au fost extrase microorganismele; aceste valori sunt numite „extant” sau valori existente în mod curent. La cealaltă extremă, atunci când condițiile de testare permit dezvoltarea completă a sistemului de sintetizare a proteinelor, care să permită o rată de creștere maximă, parametrii cinetici obținuți sunt numiți „intrinseci” și depind doar de natura substratului și de tipurile de bacterii din cultură. Orientativ, valorile extant vor fi obținute prin menținerea la o valoare scăzută a ratei de concentrare a substratului în microorganisme competente ( $S_0/X_0$ ), de exemplu la 0,025, iar valorile intrinseci apare atunci când rata este ridicată, de exemplu de cel puțin 20. În ambele cazuri,  $S_0$  trebuie să fie egală sau mai mare decât valoarea relevantă a  $K_s$ , constanta de semi-saturare.
30. Variabilitatea și alte aspecte legate de cinetica biodegradării au fost discutate în cadrul unui grup de lucru recent al SETAC. Din astfel de studii, raportate și proiectate, ar trebui să se contureze o perspectivă mai clară asupra cineticii care funcționează în instalațiile de tratare a apelor uzate, pentru a permite o interpretare mai bună a datelor existente, precum și pentru a sugera conceperea unor metode de testare mai relevante în viitor.

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
- (2) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
- (3) Birch R.R. (1991), Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment, J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

**▼M4**

- (4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996), Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology, *Wat. Res.*, 30 (3): 742-748.
- (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4-6th Sept. 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼ **M4***Apendicele 6.1***Vas poros cu control al TRN**

▼ **M4***Apendicele 6.2***Calculul constantelor cinetice**

1. Pornind de la ipoteza aplicării cineticii Monod și considerând un bilanț masic de substanțe solide active și substrat în sistemul cu nămol activ (1), se pot obține următoarele expresii pentru starea stabilă:

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

sau

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

unde:

$S_1$  = concentrația de substrat în efluent, (mg/l)

$K_s$  = constanta de semi-saturare, concentrația la care  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)

$\mu$  = rata specifică de creștere ( $d^{-1}$ )

$\mu_m$  = valoarea maximă a  $\mu_m$  ( $d^{-1}$ )

$K_d$  = rata specifică de descompunere a substanțelor solide active ( $d^{-1}$ )

$\theta_s$  = timpul mediu de retenție a nămolului, TRN (d)

Examinarea acestei ecuații conduce la următoarele concluzii:

- (i) concentrația în efluent nu depinde de cea în influent ( $S_0$ ); prin urmare, procentul de biodegradare variază în funcție de concentrația în influent,  $S_0$ ;
- (ii) singurul parametru de control al instalației care afectează  $S_1$  este timpul mediu de retenție a nămolului,  $\theta_s$ ;
- (iii) unei anumite concentrații în influent,  $S_0$ , îi va corespunde un timp critic de retenție a nămolului, astfel încât:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

unde:

$\theta_{SC}$  = timpul critic de retenție a nămolului, sub care microorganismele competente vor fi îndepărtate din instalație de apa care curge;

- (iv) întrucât ceilalți parametri din ecuația 2 sunt asociați cu cinetica creșterii, temperatura poate afecta nivelul de substrat în efluent, iar vârsta critică a nămolului, adică timpul de retenție a nămolului necesar pentru obținerea unui anumit grad de tratare, ar crește odată cu scăderea temperaturii.

2. Din bilanțul masic al substanțelor solide în sistemul cu vas poros și în ipoteza că  $X_2$ , concentrația de substanțe solide în efluent, este scăzută comparativ cu cea din vasul de aerare,  $X_1$ , timpul de retenție a nămolului.

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

**▼ M4**

și

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

unde:

$V$  = volumul vasului de aerare (l)

$X_1$  = concentrația de substanțe solide în vasul de aerare (mg/l)

$X_2$  = concentrația de substanțe solide în efluent (mg/l)

$Q_0$  = debitul influentului (l/zi)

$Q_1$  = debitul de nămol rezidual (l/zi)

Astfel, se poate controla timpul de retenție a nămolului la orice valoare prestabilită, prin controlul debitului de nămol rezidual,  $Q_1$ .

Concluzii

3. Prin urmare, scopul principal al testului este să permită prognozarea concentrației în efluent și astfel a nivelurilor de substanță chimică testată în apele care primesc substanța.
4. Prin trasarea graficului  $S_1$  în funcție de  $\theta_s$ , timpul critic de retenție a nămolului,  $\theta_{SC}$ , poate fi evaluat rapid, de exemplu curba 3 din figura 1. Atunci când acest lucru nu este posibil,  $\theta_{SC}$  poate fi calculat, împreună cu valorile aproximative ale  $\mu_m$  și  $K_s$ , prin trasarea graficului  $S_1$  în funcție de  $S_1 \cdot \theta_s$ .

Prin rearanjarea ecuației 1 se obține:

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

Atunci când  $K_d$  are o valoare mică,  $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$  și [5] devine:

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

Astfel, graficul ar trebui să fie o linie dreaptă (a se vedea figura 2) cu panta  $1/\mu_m$  și ordonata la origine  $K_s/\mu_m$ ; de asemenea,  $\theta_s \sim 1/\mu_m$ .

▼ **M4**

Figura 1

Trei temperaturi; cinci TRN

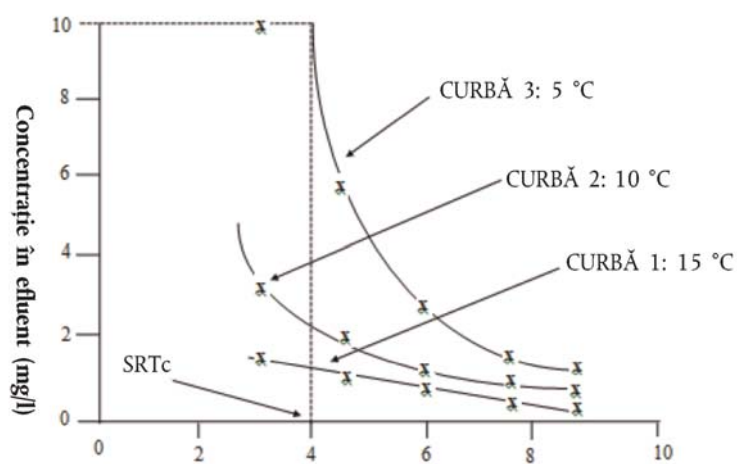
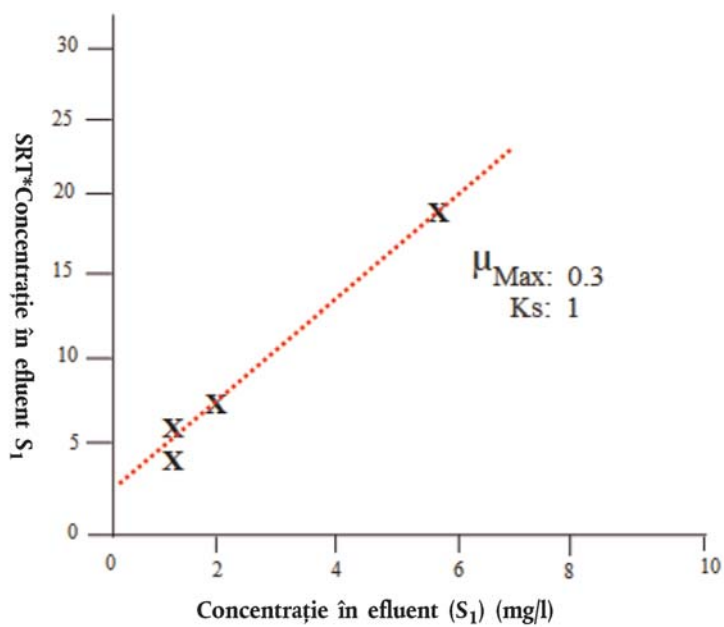


Figura 2

Linie de regresie TRN · S<sub>1</sub> în funcție de S<sub>1</sub> la T = 5 °C

Glosar:

Concentrație în efluent

Curbă

▼ **M4***Apendicele 7***TESTARE LA CONCENTRAȚII SCĂZUTE ( $\mu\text{g/l}$ )**

1. În mod normal, în mediul acvatic sunt prezente multe substanțe chimice, chiar și în apele uzate, la concentrații foarte scăzute ( $\mu\text{g/l}$ ). La astfel de concentrații probabil ele nu au rol de substraturi primare care conduc la creștere, dar sunt mai multe șanse să se degradeze sub formă de substraturi secundare, care nu determină creșterea, la concurență cu diverse substanțe chimice pe bază de carbon, care apar în mod natural. În consecință, degradările unor astfel de substanțe chimice nu se vor încadra în modelul descris în apendicele 6. Există multe modele care pot fi aplicate și, în condițiile predominante din sistemele de epurare a apelor uzate, pot funcționa simultan mai multe dintre ele. Pentru elucidarea acestei probleme vor fi necesare mult mai multe activități de cercetare.
2. Între timp, se poate urma procedura indicată în textul principal (capitolul C.10-A), dar numai pentru biodegradabilitatea primară, folosind concentrații scăzute corespunzătoare ( $< 100 \mu\text{g/l}$ ) și o procedură analitică validată. Procentul de biodegradare poate fi calculat (a se vedea punctul 54 din metoda de testare), cu condiția să se ia în considerare procesele abiotice (adsorbție, volatilitate etc.). Un exemplu este studiul făcut de Nyholm și asociații săi (1) (2), utilizând un ciclu de 4 ore într-un sistem de încărcare-descărcare. Ei au raportat constante cinetice de pseudo-prim ordin pentru 5 substanțe chimice adăugate într-o apă uzată sintetică, la o concentrație între 5 și  $100 \mu\text{g/l}$ . [Pentru biodegradabilitatea finală se pot utiliza substanțe chimice testate marcate cu  $C^{14}$ . O descriere a acestor metode depășește domeniul de aplicare al acestei metode de testare, întrucât nu există încă proceduri agreeate, cu toate că o metodă propusă pentru ISO 14592 (3) conține orientări privind utilizarea substanțelor chimice marcate cu  $C^{14}$ .]

**Testul SCAS**

3. Ulterior s-a propus un test mai simplu, în două etape (4) (5) (6); metoda semicontinuă cu nămol activ (SCAS) este urmată de teste cinetice pe termen scurt pe probe prelevate din unitățile SCAS. Sistemul SCAS funcționează cu rate cunoscute de pierdere a surplusului de nămol (spre deosebire de metoda de testare originală C.12) și este alimentat cu o apă sintetică modificată față de formula indicată de OCDE sau cu apă uzată menajeră. Apa uzată sintetică a fost modificată (din cauza schimbării valorii pH-ului și a capacității scăzute de decantare a nămolului) prin adăugarea de fosfat ca soluție tampon, extract de drojdie, clorură ferică și săruri din microelemente, iar CCO-ul său a fost crescut la circa  $750 \text{ mg/l}$ , prin creșterea concentrației de peptonă și extract de carne. Instalațiile au funcționat într-un ciclu de 24 de ore: aerare timp de 23 de ore, înlăturarea surplusului de nămol, decantare, extragerea supernatantului (efluent), urmată de adăugarea de apă uzată sintetică plus substanța chimică testată, până la  $100 \mu\text{g/l}$  (adică la aproximativ aceeași concentrație ca cea utilizată în testul de scurtă durată). O dată pe săptămână, 10 % din cantitatea totală de nămol a fost înlocuită cu nămol proaspăt, pentru a menține o populație microbiană echilibrată.
4. Se măsoară concentrațiile de substanță chimică testată de la început și de la sfârșitul operației de aerare și se continuă testul până ce se ajunge la înlăturarea unei cantități constante de substanță chimică testată; acest proces poate dura de la o săptămână până la câteva luni.

**Test de scurtă durată**

5. Un test scurt (de exemplu, de 8 ore) se aplică pentru a determina constanta cinetică de (pseudo) prim ordin pentru descompunerea substanței chimice testate în nămolul activ de origini și cu istorice cunoscute, dar diferite. În particular, se prelevează probe de nămol din reactoarele SCAS – la sfârșitul unei perioade aerobe în care concentrația de substrat organic este scăzută – în timpul unui experiment de aclimatizare (punctele 3, 4). De asemenea, nămolul se poate preleva dintr-o instalație paralelă SCAS care nu este expusă substanței chimice testate, pentru comparație. Amestecurile de nămol și

**▼ M4**

substanță chimică testată adăugate la două sau mai multe concentrații în intervalul 1-50 µg/l sunt aerate, fără să se adauge apă uzată sintetică sau un alt substrat organic. Substanța chimică testată care rămâne în soluție se determină la intervale regulate, de exemplu la fiecare oră, în funcție de capacitatea de degradare a substanței chimice, pe o perioadă care să nu depășească 24 de ore. Probele sunt centrifugate înainte de a face analiza corespunzătoare.

**Calcule**

6. Datele provenite de la instalațiile SCAS sunt utilizate pentru calculul procentului de înlăturare a substanței chimice testate (punctul 54). De asemenea, se poate calcula o constantă de rată medie,  $K_1$ , (normalizată pentru concentrația de materii solide în suspensie), cu formula:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

unde:

$t$  = timpul de aerare (23 h)

$C_e$  = concentrația la sfârșitul perioadei de aerare (µg/l)

$C_i$  = concentrația la începutul perioadei de aerare (µg/l)

$SS$  = concentrația de substanțe solide în nămolul activ (g/l)

7. La testul de scurtă durată se trasează curba logaritmică a concentrației (%) în funcție de timp, iar panta părții inițiale (degradare de 10-50 %) a curbei este echivalentă cu  $K_1$ , constanta cinetică de (pseudo) prim ordin. Constanta este normalizată în funcție de concentrația de substanțe solide în nămol, prin divizarea pantei la concentrația de substanțe solide în nămol. Rezultatul raportat trebuie să includă și detalii privind concentrațiile inițiale ale substanței chimice testate și ale materiilor solide în suspensie, timpul de retenție a nămolului, încărcarea și sursa nămolului, precum și detalii privind expunerea anterioară la substanța chimică testată (dacă este cazul).

**Variabilitatea rezultatelor**

8. Variabilitatea și alte aspecte legate de cinetica biodegradării au fost discutate în cadrul unui grup de lucru recent al SETAC (7). Din astfel de studii, raportate și proiectate, ar trebui să se contureze o perspectivă mai clară asupra cineticii care funcționează în instalațiile de tratare a apelor uzate, pentru a permite o interpretare mai bună a datelor existente, precum și pentru a sugera conceperea unor metode de testare mai relevante în viitor.

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. și Schultz B. (1992), Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors, Biodegradability Wat. Res. 26: 339-353.
- (2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. și Ostfeldt P. (1993), Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption, Wat. Res. 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998), Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.



**▼M4**

- (4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. și Frimer-Larsen H. (1996), Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and  $\mu\text{g/l}$  range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg U.T. și Nyholm N. (1996), Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low ( $\mu\text{g/l}$  range) and standard (ppm range) chemical concentrations, *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency (1996), Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm N., Berg U.T., Ingerslev F., Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., și Verstraete W., 4-6<sup>th</sup> Sept. 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼ **M4****C.10-B: Biopelicule**

## INTRODUCERE

1. În mod normal, testele de simulare se aplică la substanțele chimice care nu au trecut testul de screening pentru biodegradabilitate rapidă [capitolul C.4 A-F din prezenta anexă (9)], dar au trecut testul pentru biodegradabilitate intrinsecă. În mod excepțional, se aplică teste de simulare și la orice substanțe chimice despre care sunt necesare mai multe informații, în special cele de mare tonaj, și în mod normal se aplică testul cu nămol activ (C.10-A). În unele situații, totuși, este nevoie de informații specifice referitoare la comportamentul unei substanțe chimice față de metodele de epurare a apelor uzate care presupun utilizarea de biopelicule, mai precis filtre de percolare, contactori biologici rotativi, straturi fluidizate. Pentru îndeplinirea acestei cerințe au fost dezvoltate diverse dispozitive.
2. Gerike *et al.* (1) au folosit filtre de percolare mari, la scară pilot, pe care le-au utilizat în regim cu instalații cuplate. Aceste filtre ocupau mult spațiu și aveau nevoie de volume relativ mari de apă uzată sau apă uzată sintetică. Truesdale *et al.* (2) au descris filtre mai mici (diametru 6 picioare și 6 țoli), care au fost alimentate cu apă uzată naturală fără agenți tensioactivi, dar încă mai era nevoie de volume relativ mari. A fost nevoie de nu mai puțin de 14 săptămâni pentru dezvoltarea unei biopelicule „mature” și încă 4-8 săptămâni după prima introducere de agent tensioactiv de testare, înainte să aibă loc aclimatizarea.
3. Baumann *et al.* (3) au dezvoltat un filtru mult mai mic, care folosea material din poliester tip „fleece”, scufundat în prealabil în nămol activ, ca mediu inert de suport al biopeliculei. Substanța chimică testată a fost utilizată ca sursă unică de carbon, iar biodegradabilitatea a fost evaluată din măsurătorile carbonului organic dizolvat (COD) în influent și în efluent, precum și din cantitatea de CO<sub>2</sub> din gazul evacuat.
4. O abordare destul de diferită a fost cea adoptată de Gloyna *et al.* (4), care au inventat reactorul tubular rotativ. Pe fața internă a tubului rotativ a crescut o biopeliculă pe suprafața cunoscută, prin trecerea unui influent introdus prin partea superioară a tubului, înclinat la un unghi mic față de orizontală. Reactorul a fost utilizat pentru a studia biodegradabilitatea agenților tensioactivi (5), precum și pentru a analiza grosimea optimă a biopeliculei și difuzarea prin peliculă (6). Acești din urmă autori au dezvoltat în continuare reactorul, inclusiv prin modificarea sa pentru a putea determina nivelul de CO<sub>2</sub> în gazul evacuat.
5. Reactorul tubular rotativ a fost adoptat de Comitetul permanent al analiștilor (Regatul Unit), ca metodă standard de evaluare atât a biodegradabilității substanțelor chimice (7), cât și a tratabilității și toxicității apelor uzate (8). Metoda descrisă aici prezintă avantajul de a fi simplă, compactă, reproducibilă și de a avea nevoie de volume de mediu organic relativ mici.

## PRINCIPIUL TESTULUI

6. Apa uzată sintetică și menajeră și substanța chimică testată, în amestec sau separat, sunt aplicate pe suprafața internă a unui tub înclinat cu rotație lentă. Pe suprafața internă se dezvoltă un strat de microorganisme, similar cu cel prezent pe mediile de biofiltrare. Condițiile de funcționare a reactorului sunt alese pentru a asigura o eliminare corespunzătoare a materiei organice și, dacă este necesar, oxidarea amoniului.

▼ **M4**

7. Se colectează efluentul din tub și se decantează și/sau se filtrează înainte de analiza pentru determinarea carbonului organic dizolvat (COD) și/sau a substanței chimice testate, printr-o metodă specifică. Unitățile de control care nu primesc substanța chimică testată sunt exploatate în paralel, în aceleași condiții, în scop comparativ. Se consideră că diferența dintre concentrațiile de COD din influent în unitățile de testare și de control este datorată substanței chimice testate și metaboliților săi organici. Diferența este comparată cu concentrația substanței chimice testate adăugate (exprimată ca COD), pentru a determina eliminarea substanței chimice testate.
8. În mod normal, se poate face distincția între biodegradare și bioadsorbție, prin examinarea atentă a curbei eliminare-timp. De obicei, confirmarea se poate obține prin aplicarea unui test de biodegradare rapidă (adsorbție de oxigen sau producție de dioxid de carbon), folosind un inocul aclimatizat, prelevat la sfârșitul testului din reactoarele care primesc substanța chimică testată.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

9. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor, trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice testate.
10. În mod normal, substanțele chimice volatile și puțin solubile nu pot fi testate dacă nu se iau măsuri speciale de precauție (a se vedea apendicele 5 din capitolul C.10-A). Trebuie să se cunoască structura chimică sau cel puțin formula empirică, pentru a calcula valorile teoretice și/sau pentru a verifica valorile măsurate ale parametrilor, de exemplu consumul teoretic de oxigen (CTO), COD.
11. Informațiile legate de toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (a se vedea apendicele 4 din capitolul C.10-A) pot fi utile pentru alegerea concentrațiilor de testare adecvate și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor de biodegradare scăzute.

## NIVELURI DE TRECERE

12. Inițial, a fost necesar ca biodegradarea primară a agenților tensioactivi să ajungă la cel puțin 80 % înainte ca substanța chimică să poată fi comercializată. În cazul în care nu se atinge valoarea de 80 %, testul de simulare (de confirmare) poate fi aplicat, iar agentul tensioactiv se poate comercializa numai dacă s-a înlăturat mai mult de 90 % din substanța chimică specifică. În general, la substanțele chimice nu se pune problema de a trece sau a nu trece testul, iar valoarea înlăturării procentuale obținute poate fi utilizată în calcule aproximative ale concentrației probabile în mediu ce urmează să fie folosită în evaluarea riscurilor implicate de substanțe chimice. Într-o serie de studii privind substanțe chimice pure, s-a constatat că procentul de înlăturare a COD era > 90 % în mai mult de trei sferturi și > 80 % în peste 90 % din substanțele chimice, ceea ce a indicat un grad semnificativ de biodegradabilitate.

## SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

13. Pentru a asigura executarea corectă a procedurii experimentale, ocazional este util să se testeze substanțe chimice de referință, cu comportament cunoscut. Printre aceste substanțe se numără acidul adipic, 2-fenil-fenolul, 1-naftolul, acidul difenic și acidul 1-naftoic.

## REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

14. Un laborator din Regatul Unit a constatat că deviația standard relativă în cadrul testelor este de 3,5 %, iar între teste este de 5 % (7).

▼ **M4****DESCRIEREA METODEI****Aparatură***Reactoare tubulare rotative*

15. Aparatul (a se vedea figurile 1 și 2 din appendicele 8) este format dintr-o baterie de tuburi acrilice, fiecare cu lungime de 30,5 cm și cu diametru interior de 5 cm, care se sprijină pe roți cauciucate, montate într-un cadru de susținere metalic. Fiecare tub are o muchie exterioară, cu o adâncime de circa 0,5 cm, pentru a fi fixat pe roți, suprafața externă este înăsprită cu burete din sârmă, iar la capătul superior (de alimentare) este prevăzut cu o margine internă adâncă, cu rol de reținere a lichidului. Tuburile sunt înclinate la un unghi de aproximativ un grad față de orizontală, pentru a obține timpul de contact necesar atunci când mediul de testare este aplicat la un tub curat. Roțile cauciucate sunt rotite cu ajutorul unui motor cu viteză variabilă, lentă. Temperatura tuburilor este controlată prin instalarea într-o încăpere cu temperatura constantă.
16. Prin includerea fiecărui reactor tubular într-un tub ceva mai mare, acoperit, și asigurând etanșeitatea conexiunilor împotriva scurgerilor de gaze, gazul CO<sub>2</sub> evacuat poate fi colectat într-o soluție alcalină, pentru a fi măsurat ulterior (6).
17. Într-un vas de alimentare de 20 l se pune volumul de mediu organic necesar pentru 24 h, pentru fiecare tub, la care se adaugă substanța chimică testată, dacă este cazul. Dacă este necesar, soluția de substanță chimică testată poate fi dozată separat. Aproape de baza fiecărui vas de alimentare se află un orificiu de evacuare, conectat, prin tuburi adecvate (de exemplu, din cauciuc siliconic) și printr-o pompă peristaltică (B) la un tub de alimentare care pătrunde 2-4 cm în capătul superior (de alimentare) al tubului înclinat (C). Efluentul se lasă să se scurgă din partea inferioară a tubului înclinat, pentru a fi colectat într-un alt vas de alimentare (D). Înainte de analiză, efluentul se decantează sau se filtrează.

*Aparat de filtrare – centrifugă*

18. Dispozitiv de filtrare a probelor, cu filtre cu membrană de porozitate corespunzătoare (diametrul deschiderii nominale de 0,45 μm), care adsorb substanțele chimice organice solubile sau eliberează carbon organic la un nivel minim. Atunci când se utilizează filtre care eliberează carbon organic, ele trebuie să fie spălate cu grijă cu apă caldă, pentru a înlătura carbonul organic lixiviat. Se poate utiliza și o centrifugă care poate asigura o accelerație de 40 000 m/s<sup>2</sup>.
19. Echipamente de analiză pentru a determina:
  - COD/carbonul organic total (COT) sau consumul chimic de oxigen (CCO);
  - substanțe chimice specifice (HPLC, GC etc.) dacă este necesar;
  - pH-ul, temperatura, aciditatea și alcalinitatea;
  - conținutul de amoniu, nitriți și nitrați, în cazul în care testele se fac în condiții de nitrificare.

*Apă*

20. Apă de la robinet, cu conținut de COD mai mic de 3 mg/l.
21. Apă distilată sau deionizată, cu conținut de COD mai mic de 2 mg/l.

▼ **M4***Mediu organic*

22. Ca mediu organic se poate utiliza apă uzată sintetică, apă uzată menajeră sau un amestec din cele două. S-a demonstrat că numai prin utilizarea apei uzate menajere se ajunge la un procent crescut de eliminare a COD (în instalațiile cu nămol activ) și chiar se permite biodegradarea unor substanțe chimice care nu sunt biodegradate atunci când se utilizează apa uzată sintetică indicată de OCDE. Astfel, se recomandă utilizarea apei uzate menajere. Trebuie să se măsoare concentrația de COD (sau CCO) în fiecare lot nou de mediu organic. Trebuie să se cunoască aciditatea sau alcalinitatea mediului organic. În cazul în care mediul organic are o aciditate sau alcalinitate scăzută, ar putea fi necesar să se adauge o soluție tampon corespunzătoare (bicarbonat de sodiu sau fosfat monoacid de potasiu), pentru a menține un pH de circa  $7,5 \pm 0,5$  în reactor în timpul testului. Cantitatea de soluție tampon, precum și momentul adăugării sale se decid pentru fiecare caz în parte.

*Apă uzată sintetică*

23. În fiecare litru de apă de la robinet se dizolvă: peptonă, 160 mg; extract de carne, 110 mg; uree, 30 mg; fosfat acid de di-potasiu anhidru ( $K_2HPO_4$ ), 28 mg; clorură de sodiu ( $NaCl$ ), 7 mg; clorură de calciu dihidrat ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 4 mg; sulfat de magneziu heptahidrat, ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 2 mg. Această apă uzată sintetică din testele OCDE este un exemplu și indică o concentrație medie a COD în influent, de circa 100 mg/l. Ca metodă alternativă, se pot utiliza alte compoziții, cu aproximativ aceleași concentrații de COD, care sunt mai apropiate de apele uzate reale. Această apă uzată sintetică poate fi produsă din apă distilată într-o formă concentrată și poate fi depozitată la circa 1 °C până la o săptămână. Atunci când este nevoie să fie utilizată, se diluează cu apă de la robinet. (Acest mediu nu este satisfăcător, de exemplu concentrația de azot este foarte mare, conținutul de carbon este relativ scăzut, dar nu s-a sugerat o altă metodă mai bună, cu excepția adăugării unei cantități mai mari de fosfat, ca soluție tampon, și creșterii procentului de peptonă.)

*Apă uzată menajeră*

24. Se utilizează apă uzată proaspătă decantată, colectată zilnic dintr-o instalație de tratare care primește în special apă uzată menajeră. Apa trebuie să fie colectată din canalul deversor al rezervorului de sedimentare primară sau din alimentarea instalației de nămol activ și trebuie să fie, în mare măsură, lipsită de particule grosiere. Apa uzată poate fi utilizată după ce a fost depozitată timp de mai multe zile la circa 4 °C, dacă s-a dovedit că COD (sau CCO) nu a scăzut în mod semnificativ (adică la mai puțin de 20 %) în timpul perioadei de depozitare. Pentru a limita perturbațiile aduse sistemului, COD (sau CCO) din fiecare lot nou trebuie să fie ajustat înainte de utilizare la o valoare constantă adecvată, de exemplu prin diluarea cu apă de la robinet.

*Lubrifiant*

25. Pentru lubrifierea rolor de ghidare de la pompa peristaltică se poate utiliza glicerină sau ulei de măsline; ambele fiind adecvate pentru tuburile din cauciuc siliconic.

*Soluții stoc de substanță chimică testată*

26. Pentru substanțe chimice cu solubilitate adecvată, se prepară soluții stoc de concentrații corespunzătoare (de exemplu, de la 1 până la 5 g/l) în apă deionizată sau în partea minerală a apei uzate sintetice. Pentru substanțele chimice insolubile, a se vedea apendicele 5 din capitolul C.10-A. Această metodă nu este potrivită pentru substanțe chimice volatile dacă nu se fac modificări la reactoarele tubulare (punctul 16). Se determină COD și COT din soluția stoc și se repetă măsurătorile pentru fiecare lot nou. În cazul în care diferența dintre COD și COT este mai mare de 20 %, se verifică solubilitatea în apă a substanței chimice testate. Se compară COD sau concentrația substanței chimice testate măsurate prin analiza specifică a soluției stoc cu valoarea

▼ **M4**

nominală, pentru a verifica dacă recuperarea este suficient de bună (în mod normal se poate aștepta o valoare > 90 %). Se verifică, în special pentru dispersii, dacă COD poate fi utilizat sau nu ca parametru analitic sau dacă se poate utiliza doar o tehnică de analiză specifică pentru substanța chimică testată. Pentru dispersii este necesară centrifugarea probelor. Pentru fiecare lot nou se măsoară COD, CCO ale substanței chimice testate printr-o analiză specifică.

27. Se determină pH-ul soluției stoc. Valorile extreme indică faptul că adăugarea substanței chimice poate avea o influență asupra pH-ului nămolului activ în sistemul de testare. În acest caz, soluția stoc se neutralizează, pentru a obține un pH de  $7 \pm 0,5$ , cu mici cantități de acid sau bază anorganică, dar se evită precipitarea substanței chimice testate.

**PROCEDURĂ***Prepararea mediului organic pentru dozare*

28. Se asigură curățarea temeinică a tuturor recipientelor pentru influent și efluent și a tuburilor de la vasele pentru influent și către vasele pentru efluent, pentru a înlătura creșterea microbiană inițială și pe parcursul testului.
29. Apa uzată sintetică (punctul 23) se prepară proaspăt în fiecare zi, fie din substanțe solide, fie din soluția stoc concentrată, prin diluare corespunzătoare cu apă de la robinet. Cantitatea necesară se măsoară într-un cilindru și se adaugă într-un vas curat pentru influent. De asemenea, atunci când este nevoie, la apa uzată sintetică se adaugă, înainte de diluare, cantitatea necesară de soluție stoc din substanța chimică testată sau substanța chimică de referință. Dacă este mai convenabil sau dacă este necesar pentru evitarea pierderilor de substanță chimică testată, într-un rezervor separat se prepară o soluție diluată separată din substanța chimică testată, care este distribuită în tuburile înclinate printr-o altă pompă de dozare.
30. Ca soluție alternativă (și preferabilă), se poate utiliza apă uzată menajeră decantată (punctul 24), proaspăt colectată în fiecare zi, dacă este posibil.

*Funcționarea reactoarelor tubulare rotative*

31. Pentru evaluarea unei substanțe chimice testate este nevoie de două reactoare tubulare identice; ele sunt asamblate într-o încăpere cu temperatură constantă, în mod normal la  $22 \pm 2$  °C.
32. Pompele peristaltice se reglează pentru a debita  $250 \pm 25$  ml/h de mediu organic (fără substanță chimică testată) în tuburile înclinate, care sunt rotite la o viteză de  $18 \pm 2$  rpm. Lubrifiantul (punctul 25) se aplică la tuburile pompei la început și periodic, pe întreaga durată a testului, pentru a asigura funcționarea corespunzătoare și pentru a prelungi viața tuburilor.
33. Se reglează unghiul de înclinare a tuburilor la orizontală, în vederea obținerii unui timp de rezidență de  $125 \pm 12,5$  secunde, pentru alimentarea într-un tub curat. Se estimează timpul de retenție prin adăugarea unui marker nebiologic (de exemplu, NaCl, vopsea inertă) la alimentare: timpul necesar pentru a atinge concentrația maximă în efluent este considerat ca fiind timpul mediu de retenție (atunci când pelicula este la grosime maximă, timpul de retenție poate crește până la circa 30 de minute).
34. S-a constatat că aceste debite, viteze și timpi conduc la procente adecvate de înlăturare a COD (sau CCO) (> 80 %) și determină obținerea de efluenți nitrificați. Debitul de curgere trebuie să fie modificat în cazul în care înlăturarea este insuficientă sau dacă trebuie să fie simulată performanța unei anumite instalații de tratare. În acest din urmă caz se ajustează debitul de dozare a mediului organic până ce performanța reactorului este egală cu cea a instalației de tratare.

▼ **M4***Inoculare*

35. Inocularea pe calea aerului poate fi suficientă pentru a începe creșterea microorganismelor, atunci când se utilizează apa uzată sintetică; în alte situații, se adaugă 1 ml/l de apă uzată decantată, timp de 3 zile.

*Măsurători*

36. La intervale regulate se verifică dacă debitele de dozare și vitezele de rotație se încadrează în limitele necesare. De asemenea, se măsoară pH-ul efluentului, în special atunci când este de așteptat să apară nitrificarea.

*Prelevare de probe și analiză*

37. Metoda, tiparul și frecvența de prelevare a probelor sunt alese pentru a corespunde scopului testului. De exemplu, se prelevează probe instantanee din influent și din efluent sau se colectează probe pe o perioadă mai lungă, de exemplu 36 de ore. În prima perioadă, fără substanța chimică testată, se prelevează probe de două ori pe săptămână. Probele se filtrează prin membrane sau se centrifughează la circa 40 000 m/sec<sup>2</sup>, timp de aproximativ 15 minute (punctul 18). Poate fi necesară decantarea probelor și/sau trecerea lor printr-un filtru cu pietriș înainte de filtrarea prin membrană. Se determină COD (sau CCO) cel puțin de două ori și, dacă este necesar, CBO, conținutul de amoniu și nitrit/nitrat.
38. Toate analizele trebuie să fie efectuate imediat ce este posibil, după colectarea și pregătirea probelor. În cazul în care trebuie să se amâne analizele, probele se depozitează la 4 °C, la întuneric, în sticle pline, închise etanș. Atunci când probele trebuie să fie depozitate mai mult de 48 de ore, ele se conservă prin congelare, acidifiere sau prin adăugarea unei substanțe toxice adecvate [de exemplu, 20 ml/l dintr-o soluție de clorură de mercur (II) în concentrație de 10 g/l]. Se asigură că tehnica de conservare nu influențează rezultatul analizei.

*Perioada de pornire*

39. În această perioadă, biopelícula de suprafață crește până ajunge la o grosime optimă, perioadă care durează de obicei 2 săptămâni și nu trebuie să depășească 6 săptămâni. Gradul de înlăturare (punctul 44) a COD (sau CCO) crește și atinge o valoare de platou. Atunci când nivelul de platou a ajuns la o valoare similară în ambele tuburi, unul dintre ele este selectat ca martor în restul testului, timp în care funcționarea sa trebuie să se mențină în aceiași parametri.

*Introducerea substanței chimice testate*

40. În această etapă se adaugă substanța chimică testată la celălalt reactor, în concentrația necesară, de obicei 1 020 mg C/l. Tubul martor continuă să primească doar mediul organic.

*Perioada de aclimatizare*

41. Analizele pentru COD (sau CCO) continuă de două ori pe săptămână și, în cazul în care trebuie să se evalueze biodegradabilitatea primară, se măsoară concentrația substanței chimice testate prin analiză specifică. Pentru apariția aclimatizării este nevoie să treacă o perioadă de una până la șase săptămâni (sau mai mult, în condiții specifice) după prima introducere a substanței chimice testate. Atunci când procentul de înlăturare (punctele 43-45) atinge o valoare maximă, trebuie să se obțină 12-15 valori valabile în faza de platou, timp de circa 3 săptămâni, pentru evaluarea procentului mediu de înlăturare. Testul se consideră complet atunci când s-a atins un grad de eliminare suficient de mare. În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 12 săptămâni de la prima introducere a substanței chimice testate.

**▼ M4***Desprinderea peliculei*

42. Înlăturarea bruscă a unor cantități mari de peliculă în exces din tuburi, numită desprindere, are loc la intervale relativ regulate. Pentru a asigura că nu este afectat caracterul comparabil al rezultatelor, testele trebuie să acopere cel puțin două cicluri complete de creștere și desprindere.

**DATE ȘI RAPORT****Interpretarea rezultatelor**

43. Se calculează procentul de eliminare a COD (sau CCO) din substanța chimică testată, pentru fiecare evaluare într-un interval de timp, cu ecuația:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_o)] / C_s \%$$

unde:

$D_t$  = procent de eliminare a COD (sau CCO) la momentul  $t$

$C_s$  = concentrația de COD (sau CCO) în influent, datorită substanței chimice testate, de preferință estimată din concentrația în soluția stoc și volumul adăugat (mg/l)

$E$  = valoarea COD (sau CCO) măsurată în efluentul de testare la momentul  $t$  (mg/l)

$E_o$  = valoarea COD (sau CCO) măsurată în efluentul de control la momentul  $t$  (mg/l)

Calculul se repetă pentru substanța chimică de referință, dacă este testată.

**Funcționarea reactorului martor**

44. Gradul de eliminare a COD (sau CCO) ( $D_B$ ) din mediul organic în reactoarele martor este o informație utilă pentru evaluarea activității de biodegradare a biopeliculei în timpul testului. Se calculează procentul de eliminare cu ecuația:

$$D_B = 100 (1 - E_o / C_m) \%$$

unde:

$C_m$  = valoarea COD (sau CCO) a mediului organic în influentul de control (mg/l)

45. Se calculează înlăturarea ( $D_{ST}$ ) substanței chimice testate, dacă este măsurată, cu o metodă analitică specifică la fiecare evaluare temporală, cu ecuația:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e / S_i) \%$$

unde:

$S_i$  = concentrația măsurată sau, de preferință, estimată a substanței chimice testate în influentul de testare (mg/l)

$S_e$  = concentrația de substanță chimică testată măsurată în efluentul de testare la momentul  $t$  (mg/l)



**▼ M4**

În cazul în care metoda analitică indică o valoare pozitivă în apa uzată nemodificată echivalentă cu  $S_c$  mg/l, se calculează procentul de eliminare ( $D_{SC}$ ), cu formula:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c) / (S_i + S_c) \%$$

**Exprimarea rezultatelor testului**

46. Se trasează graficul eliminării procentuale  $D_t$  și  $D_{ST}$  (sau  $D_{SC}$ , dacă este disponibilă), în funcție de timp (a se vedea apendicele 2 din capitolul C.10-A). Se calculează media (rotunjită la cel mai apropiat număr întreg) și deviația standard ale celor 12-15 valori pentru  $D_T$  (și pentru  $D_{ST}$ , dacă este disponibilă) obținute în faza de platou, ca procent de eliminare a substanței chimice testate. Din forma curbei de eliminare se pot trage unele concluzii privind procesele de eliminare.

**Adsorbție**

47. Dacă la începutul testului se observă un nivel ridicat de eliminare a COD din substanța chimică testată, probabil că substanța chimică testată este eliminată prin adsorbție pe biopeliculă. Acest lucru poate fi dovedit prin determinarea substanței chimice testate adsorbite pe solidele desprinse de pe peliculă. Nu este uzual ca nivelul de eliminare a COD din substanțele chimice adsorbabile să rămână ridicat pe toată durata testului; în mod normal, eliminarea este mai pronunțată la început, iar apoi scade treptat până la o valoare de echilibru. Totuși, dacă substanța chimică testată adsorbabilă a putut conduce la aclimatizarea populației microbiene, gradul de eliminare a COD din substanța chimică testată ar urma să crească ulterior, ajungând la o valoare de platou ridicată.

**Fază de latență**

48. La fel ca în cazul testelor statice de screening, pentru multe substanțe chimice testate este nevoie de o fază de latență înainte de apariția biodegradării totale. În faza de latență, aclimatizarea (sau adaptarea) bacteriilor competente are loc aproape fără nicio eliminare din substanța chimică testată; apoi apare creșterea inițială a acestor bacterii. Această fază se încheie, iar faza de degradare se consideră că începe, în mod arbitrar, atunci când este înlăturată circa 10 % din cantitatea totală de substanță chimică testată (după ce se lasă timp pentru adsorbție, dacă apare). Faza de latență este adesea foarte variabilă și slab reproductibilă.

**Fază de platou**

49. Faza de platou a unei curbe de eliminare dintr-un test continuu este definită ca fiind faza în care are loc degradarea maximă. Faza de platou trebuie să dureze cel puțin 3 săptămâni și să conțină circa 12-15 valori măsurate valabile.

**Grad mediu de eliminare a substanței chimice testate**

50. Se calculează valoarea medie din valorile de eliminare  $D_t$  (și  $D_{st}$ , dacă este disponibilă) ale substanței chimice testate în faza de platou. Rotunjit la cel mai apropiat număr întreg (1 %), reprezintă gradul de eliminare a substanței chimice testate. De asemenea, se recomandă calcularea intervalului de încredere de 95 % pentru valoarea medie. În mod similar, se calculează gradul mediu ( $D_B$ ) de eliminare a mediului organic în vasul de control.

**▼ M4****Indicarea biodegradării**

51. Dacă substanța chimică testată nu se adsoarbe în mod semnificativ pe biopeliculă și curba de eliminare are forma tipică a unei curbe de biodegradare cu faze de latență, degradare și platou (punctele 48, 49), eliminarea măsurată poate fi atribuită fără ezitare biodegradării. Dacă are loc o înlăturare inițială, testul de simulare nu poate face diferența între procesele de eliminare biologică și abiotică. În asemenea cazuri, precum și în alte cazuri în care există dubii privind biodegradarea (de exemplu, dacă are loc procesul de stripping), se analizează substanțele chimice testate adsorbite sau se efectuează teste statice (de screening) suplimentare pentru biodegradare, pe baza parametrilor care indică în mod clar procese biologice. Astfel de teste sunt metodele de absorbție de oxigen (capitolul C.4 D, E și F din prezenta anexă) (9) sau un test prin care se măsoară producția de CO<sub>2</sub> (capitolul C.4 C din prezenta anexă sau metoda Headspace) (10); ca inocul, se folosește biopeliculă preexpusă de la reactorul corespunzător.
52. Dacă s-au măsurat atât eliminarea COD, cât și eliminarea substanței chimice specifice, diferențele semnificative (prima fiind mai scăzută decât a doua) dintre procente eliminate indică prezența de produse organice intermediare în efluenți, care pot fi mai dificil de degradat; acestea trebuie să fie analizate.

**Validarea rezultatelor testelor**

53. Testul este considerat valabil dacă gradul de eliminare a COD (sau CCO) (D<sub>B</sub>) în unitățile de control este > 80 % după două săptămâni și nu s-au înregistrat observații neobișnuite.
54. În cazul în care s-a testat o substanță chimică ușor biodegradabilă (de referință), gradul de biodegradare trebuie să fie > 90 %, iar diferența dintre valorile pentru probe duplicate să nu fie mai mare de 5 %. Atunci când nu se respectă aceste două criterii, se revizuiesc procedurile experimentale și/sau se obține apă uzată menajeră din altă sursă.
55. Similar, diferențele dintre valorile de biodegradare de la unitățile duplicate (dacă se utilizează) care tratează o substanță chimică testată nu trebuie să difere cu mai mult de 5 %. Dacă nu se îndeplinește acest criteriu, dar procente de eliminare sunt mari, se continuă analiza timp de trei săptămâni. În cazul în care gradul de eliminare este scăzut, se analizează efectele inhibitoare ale substanței chimice testate, dacă nu sunt cunoscute, și se repetă testul la o concentrație mai scăzută de substanță chimică testată, dacă acest lucru este posibil.

**Raport de testare**

56. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică testată:*

- date de identificare;
- natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice.

*Condițiile de testare:*

- orice modificări ale sistemului de testare, în special atunci când se testează substanțe insolubile sau volatile;
- tipul mediului organic;
- proporția și natura apelor reziduale industriale prezente în apele uzate, dacă sunt utilizate și dacă se cunosc;
- metoda de inoculare;

**▼ M4**

- conținutul de COD (carbon organic dizolvat) și COT (carbon organic total) în soluția stoc de substanță chimică testată; modul de preparare, dacă este în suspensie; concentrația (concentrațiile) de testare, motivul, dacă COD este în afara domeniului 10-20 mg/l; metoda de adăugare; data primei adăugări; orice modificări ale concentrației;
- timpul mediu de retenție hidraulică (fără creștere); viteza de rotație a tubului; unghiul de înclinare aproximativ, dacă este posibil;
- detalii privind desprinderea; durata și intensitatea;
- temperatura și domeniul de testare;
- tehnicile de analiză utilizate.

*Rezultatele testului:*

- toate datele măsurate pentru COD, CCO, analize specifice, pH, temperatură, substanțe azotoase, dacă sunt relevante;
- toate datele calculate privind  $D_t$  (sau  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_s$  obținute în formă de tabel și curbe de eliminare;
- informații privind fazele de latență și platou, durata de testare, gradul de eliminare a substanței chimice testate, a substanței chimice de referință (dacă este testată) și a mediului organic (în unitatea de control), împreună cu informații statistice și specificații privind biodegradabilitatea și valabilitatea testului;
- discutarea rezultatelor.

*BIBLIOGRAFIE:*

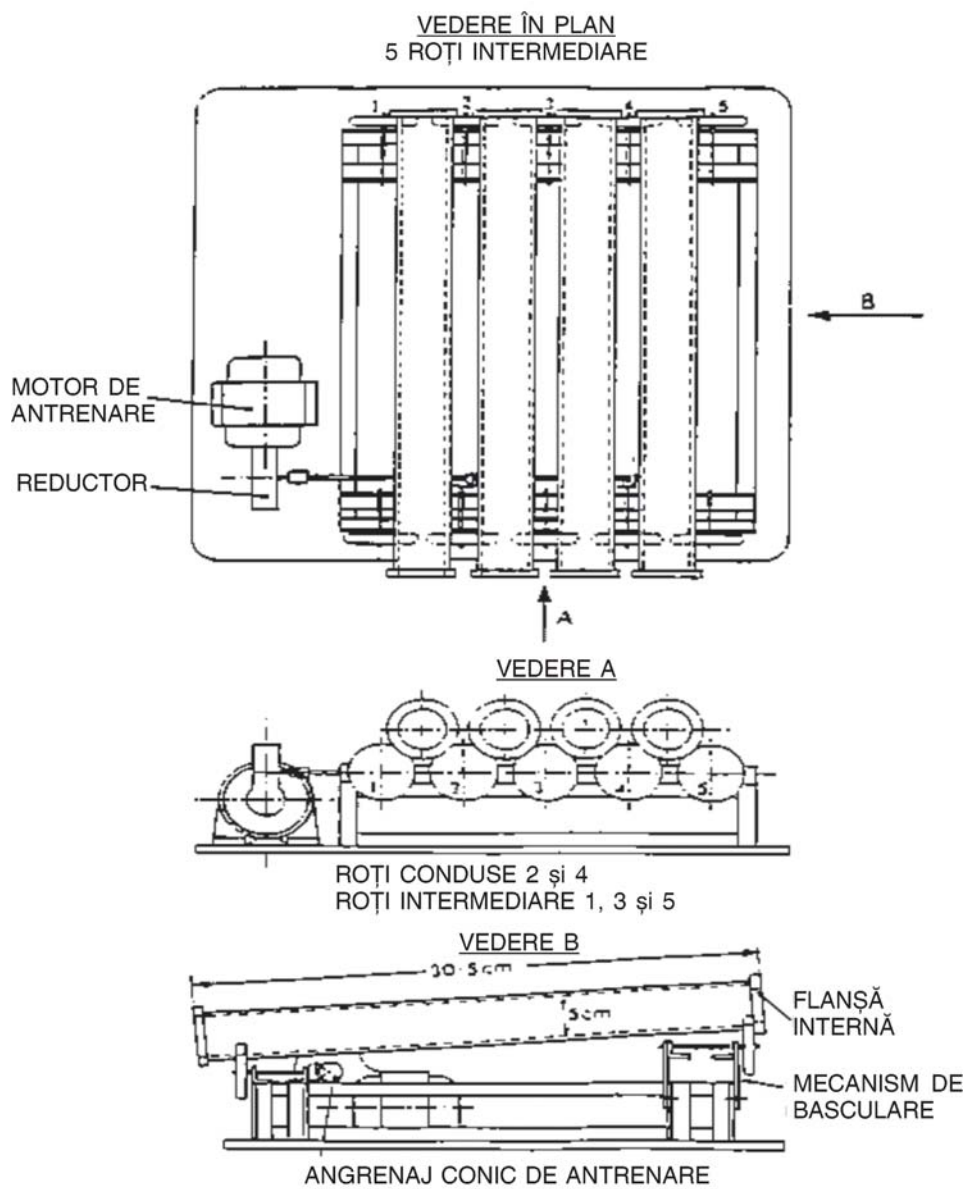
- (1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test, Wat. Res. 14: 753758.
- (2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959), Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material, Wat. Waste Tr. J. 7: 441444.
- (3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952), Rotary tubes as experimental trickling filters, Sewage ind. Waste 24: 13551357.
- (5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966), LAS removal across an institutional trickling filter, JAOCS 43: 9294.
- (6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966), Biological oxidation of sewage by films of microorganisms, Int. J. Air Wat. Pollut. 10: 865881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982), Methods for the examination of waters and associated materials, Assessment of biodegradability, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984), Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- (9) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide»”, A-F.
- (10) ISO 14593 (1998), Calitatea apei. Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetic (Încercare cu CO<sub>2</sub> în spațiul superior).

▼ **M4**

## Apendicele 8

## Figura 1

## Tuburi rotative



## Glosar:

Vedere în plan

Vedere A/B

Roți conduse

Roți intermediare

Motor de antrenare

Reductor

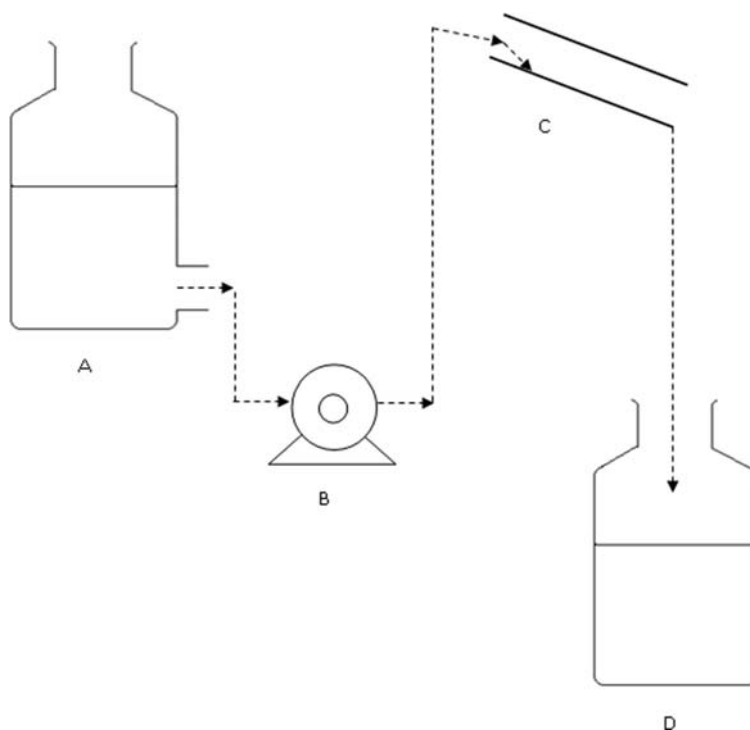
Flanșă internă

Mecanism de basculare

Angrenaj conic de antrenare

▼ **M4**

*Figura 2*  
**Diagramă flux**



- A: Rezervor de alimentare  
 B: Pompă peristaltică  
 C: Tub rotativ  
 D: Vas colector al efluentului

**DEFINIȚII**

*Substanță chimică testată:* orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

*Substanțe chimice:* „Trebuie să se noteze faptul că termenul «substanță chimică» este utilizat pe scară largă în acordurile UNCED și documentele ulterioare, pentru a include substanțe, produse, amestecuri, preparate sau orice alți termeni care pot fi utilizați în sistemele existente pentru a indica acoperirea”.

## ▼ M6

C.11. NĂMOL ACTIV, TEST DE INHIBARE A RESPIRAȚIEI  
(OXIDAREA CARBONULUI ȘI A AMONIULUI)

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 209 (2010). Această metodă de testare descrie o metodă de determinare a efectelor unei substanțe chimice asupra microorganismelor din nămolul activ (în mare parte bacterii) prin măsurarea vitezei de respirație (oxidarea carbonului și/sau a amoniului) în condiții definite, în prezența a diferite concentrații ale substanței chimice de testare. Metoda de testare se bazează pe testul ETAD – *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry* (Asociația ecologică și toxicologică a producătorilor de coloranți) (1) (2), pe Orientarea anterioară a OCDE TG nr. 209 (3) și pe standardul ISO 8192 revizuit (4). Obiectivul acestui test este furnizarea unei metode de evaluare rapide a efectelor substanțelor chimice asupra microorganismelor din nămolul activ în etapa biologică (aerobă) a stațiilor de epurare a apelor uzate. Rezultatele testului pot, de asemenea, să indice concentrațiile neinhbitoare ale substanțelor chimice de testare care se utilizează în testele de biodegradabilitate (de exemplu capitolele C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 și C.29 din prezenta anexă, Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 302C). În acest caz, testul poate fi realizat ca un test de depistare, similar unui test de stabilire a intervalului sau unui test la valori-limită (a se vedea punctul 39), luând în considerare numai respirația totală. Cu toate acestea, aceste informații trebuie luate în considerare cu precauție pentru testele de biodegradabilitate rapidă (capitolele C.4 A-F și C.29 ale prezentei anexe) pentru care concentrația inoculului este semnificativ mai scăzută decât cea utilizată în prezenta metodă de testare. Într-adevăr, absența inhibiției în acest test de respirație nu are ca rezultat automat condițiile neinhbitoare din testele de biodegradabilitate rapidă din capitolul C.4 A-F sau C.29 al prezentei anexe.
2. În general, testul de inhibare a respirației pare să fi fost aplicat cu succes de la prima sa publicare, însă în câteva cazuri au fost raportate rezultate eronate, de exemplu (2) (4) (5). Curbele de respirație în funcție de concentrație sunt uneori bifazice, graficele doză-răspuns au fost denaturate, iar valorile EC<sub>50</sub> au fost neașteptat de scăzute (5). Cercetările au arătat că aceste rezultate apar atunci când nămolul activ utilizat pentru test este puternic nitrifiant și când substanța chimică de testare are un efect mai puternic asupra oxidării amoniului decât asupra oxidării heterotrofe generale. Prin urmare, aceste rezultate eronate pot fi evitate prin realizarea unui test suplimentar utilizând un inhibitor specific al nitrificării. Prin măsurarea oxigenului consumat în prezența și în absența unui astfel de inhibitor, de exemplu N-alitioureea (ATU), poate fi calculat separat consumul de oxigen total, heterotrof și legat de nitrificare (4) (7) (8). Astfel efectele inhibitorii ale unei substanțe chimice de testare asupra celor două procese pot fi determinate și valorile EC<sub>50</sub> atât pentru oxidarea carbonului organic (heterotrofă), cât și pentru oxidarea amoniului (nitrificare) pot fi calculate prin metoda clasică. Trebuie avut în vedere că în anumite cazuri rare, efectul inhibitor al N-alitioureei poate fi anulat parțial sau complet dacă aceasta formează complexe cu substanțele chimice de testare sau cu adjuvanții de mediu, de exemplu ioni Cu<sup>++</sup> (6). Ioni Cu<sup>++</sup> sunt esențiali pentru *Nitrosomonas*, dar sunt toxici în concentrații mai mari.
3. Nevoia de nitrificare pentru epurarea aerobă a apelor uzate, ca etapă necesară a procesului de eliminare a compușilor de azot din apele uzate prin denitrificarea în produse gazoase, a devenit urgentă în special în țările europene; UE a stabilit limite mai scăzute pentru concentrația de azot din efluenții tratați deversați în corpurile de apă receptoare<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Directiva 91/271/CEE a Consiliului din 21 mai 1991 privind tratarea apelor urbane reziduale. JO L 135, 30.5.1991, p. 40.

**▼ M6**

4. În general metoda de evaluare doar a efectului asupra proceselor de oxidare a carbonului organic este adecvată. Totuși, în unele cazuri, pentru a interpreta rezultatele și a înțelege efectele este necesară o examinare a efectului doar asupra nitrificării sau a efectului asupra nitrificării și a oxidării carbonului organic separat.

**PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

5. Vitezele de respirație ale probelor de nămol activ alimentate cu apă uzată sintetică sunt măsurate într-o celulă ermetică care conține un electrod de oxigen după o perioadă de contact de 3 ore. În funcție de un scenariu de expunere realist, ar putea fi adecvat un timp de contact mai îndelungat. Dacă substanța chimică de testare se degradează rapid, de exemplu abiotice prin hidroliză, sau este volatilă și concentrația nu poate fi menținută la un nivel adecvat, se poate utiliza suplimentar o perioadă de expunere mai scurtă, de exemplu de 30 de minute. Sensibilitatea fiecărui lot de nămol activ ar trebui verificată cu o substanță chimică de referință adecvată în ziua expunerii. Testul se utilizează în general pentru a determina  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{50}$ ) a substanței chimice de testare și/sau a concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC).
6. Inhibarea consumului de oxigen al microorganismelor care oxidează carbonul organic poate fi exprimată separat de cea a microorganismelor care oxidează amoniul prin măsurarea vitezelor consumului de oxigen în absența și în prezența N-alitioureei, un inhibitor specific al oxidării amoniului în nitrit de către bacteriile nitrificante din prima etapă. În acest caz, procentajul de inhibare a vitezei consumului de oxigen se calculează prin compararea vitezei consumului de oxigen în prezența unei substanțe chimice de testare cu viteza medie a consumului de oxigen al probelor de control care nu conțin nicio substanță chimică de testare, atât în prezența, cât și în absența inhibitorului specific, N-alitioureea.
7. Orice consum de oxigen generat de procese abiotice poate fi detectat prin determinarea vitezei în amestecuri formate din substanța chimică de testare, apă uzată sintetică și apă, omițând nămolul activ.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE**

8. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor ar trebui să se cunoască identitatea (de preferat numărul CAS), numele (IUPAC), puritatea, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice de testare. În mod normal, substanțele chimice volatile nu pot fi testate în mod adecvat fără luarea unor măsuri de precauție speciale (a se vedea punctul 21).

**APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE**

9. Metoda de testare poate fi aplicată substanțelor chimice solubile în apă, puțin solubile și volatile. Cu toate acestea, se poate să nu fie întotdeauna posibilă obținerea valorilor  $EC_{50}$  cu substanțe chimice cu solubilitate limitată, iar cu substanțe chimice volatile pot fi obținute rezultate valide numai cu condiția ca marea parte (de exemplu > 80 %) a substanței chimice de testare să rămână în amestecul de reacție la sfârșitul perioadei (perioadelor) de expunere. Atunci când există incertitudini referitoare la stabilitatea sau volatilitatea substanței chimice de testare, ar trebui prezentate date analitice suplimentare pentru a rafina concentrația  $EC_x$ .

**▼ M6****SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ**

10. Substanțele chimice de referință ar trebui testate periodic pentru a se garanta fiabilitatea metodei de testare și a condițiilor de testare și pentru a verifica sensibilitatea fiecărui lot de nămol activ utilizat ca inocul microbian în ziua expunerii. Substanța chimică recomandată ca substanță chimică inhibitoare de referință este 3,5-diclorfenolul (3,5-DCP), întrucât este un cunoscut inhibitor al respirației și este utilizat în multe tipuri de teste de inhibare/toxicitate (4). Sulfatul de cupru (II) pentahidrat poate fi, de asemenea, utilizat ca substanță chimică de referință pentru inhibarea respirației totale (9). N-metilanilina poate fi utilizată ca inhibitor de referință specific al nitrificării (4).

**CRITERII DE VALIDITATE ȘI REPRODUCIBILITATE**

11. Viteza consumului de oxigen al probelor de control neutre (fără substanță chimică de testare sau de referință) nu ar trebui să fie mai mică de 20 mg de oxigen per gram de nămol activ (greutatea uscată a solidelor în suspensie) pe oră. Dacă viteza este mai mică, testul ar trebui repetat cu nămol activ spălat sau cu nămol din altă sursă. Coeficientul de variație al vitezei consumului de oxigen la probele de control duplicate nu ar trebui să fie mai mare de 30 % la încheierea testului final.
12. În cadrul unui ring test internațional organizat în 2004 de ISO (4) utilizând nămol activ derivat din apele uzate menajere, s-a constatat că  $EC_{50}$  a 3,5-DCP este cuprinsă între 2 mg/l și 25 mg/l pentru respirația totală, între 5 mg/l și 40 mg/l pentru respirația heterotrofă și între 0,1 mg/l și 10 mg/l pentru respirația legată de nitrificare. Dacă  $EC_{50}$  a 3,5-DCP nu se încadrează în intervalul așteptat, testul ar trebui repetat cu nămol activ din altă sursă.  $EC_{50}$  a sulfatului de cupru (II) pentahidrat ar trebui să se încadreze în intervalul 53-155 mg/l pentru respirația totală (9).

**DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Vasele și aparatura de testare**

13. Trebuie utilizate echipamentele obișnuite de laborator și următoarele:
  - (a) vase de testare – de exemplu, pahare Berzelius de 1 000 ml care să conțină 500 ml de amestec de reacție (a se vedea punctul 5 din fig. 1);
  - (b) celule și mijloace de fixare pentru măsurarea concentrației oxigenului dizolvat; un electrod de oxigen adecvat; o celulă ermetică care să conțină proba, fără spațiu gol și dotată cu un înregistrator (de exemplu, punctele 7, 8, 9 din fig. 1 din apendicele 2); alternativ, se poate utiliza un vas CBO cu adaptor de tip manșon pentru fixarea ermetică a electrodului de oxigen pe gâtul vasului (a se vedea fig. 2 din apendicele 3). Pentru a evita pierderea de lichid prin revărsare la introducerea electrodului de oxigen, se recomandă introducerea în prealabil a unei pâlnii sau a unui tub de sticlă prin manșon sau utilizarea unor vase cu margini evazate. În ambele cazuri, ar trebui utilizat un agitator magnetic sau o altă metodă de agitare, de exemplu, o sondă autoagitatoare;
  - (c) agitatoare și bare magnetice acoperite cu material inert, pentru utilizarea în camera de măsurare și/sau în vasele de testare;
  - (d) dispozitiv de aerare: dacă este necesar, ar trebui să se utilizeze aer comprimat care să treacă printr-un filtru adecvat pentru a îndepărta praful și uleiul și prin pisetele care conțin apă pentru umidificarea



**▼ M6**

aerului. Conținutul vaselor trebuie aerat cu ajutorul pipetelor Pasteur sau al altor dispozitive de aerare care nu adsorb substanțele chimice. Se poate utiliza un agitator orbital cu o viteză orbitală cuprinsă între 150 și 250 rpm cu flacoane de 2 000ml, de exemplu, pentru a satisface cererea de oxigen a nămolului și a depăși dificultățile create de substanțele chimice care produc spumă în exces, care sunt volatile și, prin urmare, pierdute, sau care sunt dificil de dispersat atunci când sunt aerate prin barbotare cu aer. Sistemul de testare este format în general dintr-o serie de pahare aerate continuu și pregătite secvențial (de exemplu, la intervale de cca 10-15 minute), apoi analizate în mod secvențial. Poate fi utilizat, de asemenea, orice instrument care permite concomitent aerarea și măsurarea vitezei consumului de oxigen ale amestecurilor;

(e) pH-metru;

(f) centrifugă, centrifugă de laborator clasică pentru nămol cu capacitate de 10 000 m/s<sup>2</sup>.

**Reactivi**

14. Pe parcursul întregului test se utilizează reactivi de puritate analitică.

**Apă**

15. Se utilizează apă distilată sau deionizată care să conțină sub 1mg/l de COD, cu excepția cazurilor în care se specifică utilizarea de apă fără clor de la robinet.

**Apă uzată sintetică**

16. Mediul ar trebui preparat astfel încât să conțină următorii constituenți în cantitățile specificate:

|  |       |
|--|-------|
| — peptonă  | 16 g  |
| — extract de carne (sau un extract vegetal comparabil)                   | 11 g  |
| — uree   | 3 g   |
| — clorură de sodiu (NaCl)  | 0,7 g |
| — clorură de calciu dihidrat (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)     | 0,4 g |
| — sulfat de magneziu heptahidrat (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) | 0,2 g |
| — fosfat acid de potasiu anhidru (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )      | 2,8 g |
| — apă distilată sau deionizată până la 1 litru.                          |       |

17. PH-ul acestei soluții trebuie să fie de  $7,5 \pm 0,5$ . Dacă mediul preparat nu se utilizează imediat, acesta ar trebui depozitat la întuneric la o temperatură cuprinsă între 0 °C și 4 °C timp de cel mult 1 săptămână sau în condiții care nu îi modifică compoziția. Trebuie avut în vedere că această apă uzată sintetică este de 100 de ori mai concentrată decât cea descrisă în raportul tehnic al OCDE „Metodă propusă pentru determinarea biodegradabilității agenților tensioactivi folosiți la detergenții sintetici” din 11 iunie 1976 și conține în plus fosfat acid dipotasic.

**▼ M6**

18. În mod alternativ, componentele mediului pot fi sterilizate individual înainte de depozitare sau peptona și extractul de carne pot fi adăugate puțin înainte de efectuarea testului. Înainte de utilizare, mediul trebuie bine amestecat, iar pH-ul trebuie ajustat la  $7,5 \pm 0,5$ , dacă este cazul.

**Substanța chimică de testare**

19. Trebuie pregătită o soluție stoc pentru substanțele de testare ușor solubile în apă numai până la solubilitatea maximă în apă (precipitatele nu sunt acceptate). Substanțele puțin solubile în apă, amestecurile ale căror componente au solubilități diferite în apă și substanțele adsorbante trebuie cântărite direct în vasele de testare. În aceste cazuri, utilizarea soluțiilor stoc poate fi o alternativă dacă concentrațiile dizolvate ale substanțelor chimice de testare sunt determinate analitic în vasele de testare (înainte de adăugarea nămolului activ). Dacă se prepară fracțiuni adaptate la apă (WAF), este esențială și determinarea analitică a concentrațiilor dizolvate ale substanțelor chimice de testare în vasele de testare. Trebuie evitată utilizarea de solvenți organici, agenți de dispersie/emulgatori pentru îmbunătățirea solubilității. Ultrasonizarea soluțiilor stoc și agitarea prealabilă a suspensiilor, de exemplu peste noapte, sunt posibile atunci când sunt disponibile informații adecvate privind stabilitatea substanței chimice de testare în astfel de condiții.
20. Substanța chimică de testare poate afecta pH-ul din sistemul de testare. pH-ul amestecurilor tratate cu substanța chimică de testare ar trebui determinat înainte de efectuarea testului, în cadrul unui test preliminar, pentru a stabili dacă va fi necesară ajustarea pH-ului înainte de testul principal și din nou în ziua efectuării testului principal. Soluțiile/suspensiile apoase ale substanței chimice de testare trebuie neutralizate înainte de adăugarea inoculului, dacă este necesar. Cu toate acestea, având în vedere că neutralizarea poate modifica proprietățile chimice ale substanței chimice, pot fi efectuate, în funcție de scop, teste suplimentare pentru evaluarea efectului substanței chimice de testare asupra nămolului fără ajustarea pH-ului.
21. Efectele toxice ale substanțelor chimice volatile, în special în testele în care aerul este barbotat în sistem, pot avea intensități diferite din cauza pierderilor de substanță de pe parcursul perioadei de expunere. În cazul acestor substanțe sunt necesare măsuri de precauție precum efectuarea unei analize specifice ale substanțelor din amestecurile de control care conțin substanța și modificarea regimului de aerare.

**Substanța chimică de referință**

22. Dacă substanța chimică de referință utilizată este 3,5-diclorfenolul, se prepară o soluție de 1,00 g de 3,5-diclorfenol în 1 000 ml de apă (15). Pentru accelerarea dizolvării trebuie utilizată apă caldă/ultrasonizarea, soluția ajungând la volumul său final numai după răcirea la temperatura camerei. Trebuie asigurat totuși faptul că structura substanței chimice de referință nu este modificată. PH-ul soluției trebuie verificat și ajustat, dacă este necesar, cu NaOH sau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> până la un pH de 7-8.
23. Dacă substanța chimică de referință utilizată este sulfatul de cupru (II) pentahidrat, se utilizează concentrații de 58 mg/l, 100 mg/l și 180 mg/l (factor de 1,8). Substanța se cântărește direct în vasele de testare (29, 50 și 90 mg pentru un volum total de 500 ml). Apoi se dizolvă în 234 ml de apă de la robinet sterilizată în autoclavă. Sulfatul de cupru (II) pentahidrat este ușor solubil. Când se începe testul, se adaugă 16 ml de apă uzată sintetică și 250 ml de nămol activ.

**▼ M6****Inhibitor specific al nitrificării**

24. Se prepară o soluție stoc de N-alitiouree (ATU) cu o concentrație de 2,32 g/l. Adăugarea a 2,5 ml din această soluție stoc într-un amestec de incubare cu volum final de 500 ml are ca rezultat o concentrație de ATU de 11,6 mg/l ( $10^{-4}$  mol/l), despre care se știe că este suficientă (4) pentru a inhiba 100 % nitrificarea dintr-un nămol activ nitrifiant care conține 1,5 g/l de solide în suspensie.

**Probă de control abiotică**

25. În unele condiții rare, o substanță chimică de testare puternic reductoare poate antrena un consum de oxigen abiotice măsurabil. În aceste cazuri sunt necesare probe de control abiotice pentru a face distincția între consumul de oxigen abiotice al substanței chimice de testare și respirația microbială. Probele de control abiotice pot fi preparate prin eliminarea inoculului din amestecurile de testare. În mod similar, atunci când se realizează măsurători analitice de sprijin, pot fi incluse probe de control abiotice pentru a determina concentrația obținută pe parcursul etapei de expunere a testului, de exemplu, atunci când se utilizează soluții stoc de substanțe chimice puțin solubile în apă cu componente având solubilitate diferită în apă. În cazuri specifice, poate fi necesară prepararea unei probe de control abiotice cu inocul sterilizat (de exemplu prin autoclavare sau prin adăugarea de agenți toxici sterilizanți). Anumite substanțe chimice pot produce sau consuma oxigen numai dacă suprafața este destul de mare pentru reacție, chiar dacă pentru acest lucru au în mod obișnuit nevoie de o temperatură sau o presiune mult mai ridicată. În această privință, trebuie acordată o atenție specială substanțelor peroxidice. Un inocul sterilizat prezintă o suprafață mare.

**Inocul**

26. Pentru utilizare generală, nămolul activ se colectează la ieșirea sau aproape de ieșirea bazinului de aerare al unei stații de epurare a apelor uzate bine exploatate care este alimentată predominant cu ape uzate menajere. În funcție de scopul testului, pot fi utilizate și alte tipuri sau surse adecvate de nămol activ, de exemplu, nămolul crescut în laborator la concentrații adecvate de solide în suspensie cuprinse între 2 g/l și 4 g/l. Cu toate acestea, nămolurile provenind de la stații de epurare diferite pot prezenta caracteristici și sensibilități diferite.
27. Nămolul poate fi utilizat ca atare, însă particulele mari trebuie eliminate prin limpezire pentru o perioadă scurtă, 5-15 minute, și prin decantarea stratului superior de solide fine sau strecurare (de exemplu, sită de 1 mm<sup>2</sup>). O altă variantă ar fi omogenizarea nămolului într-un blender timp de cca 15 secunde sau mai mult, însă trebuie acordată atenție forțelor de forfecare și modificărilor temperaturii care pot apărea în cazul perioadelor lungi de amestecare.
28. Spălarea nămolului este adesea necesară, de exemplu, dacă viteza de respirație endogenă este scăzută. Nămolul trebuie să fie mai întâi centrifugat pentru o anumită perioadă pentru a produce un lichid supernatant limpede și granule de solide din apa uzată, de exemplu 10 minute la cca 10 000 m/s<sup>2</sup>. Lichidul supernatant se elimină, iar nămolul este repus în suspensie prin agitare în apă de la robinet fără clor. Această apă de spălare trebuie apoi eliminată prin recentrifugare. Procesul de spălare și centrifugare se repetă, dacă este necesar. Trebuie determinată masa uscată a unui volum cunoscut de nămol repus în suspensie, iar nămolul trebuie concentrat prin eliminarea lichidului sau diluat în apă de la robinet fără clor pentru a obține concentrația de solide necesară a nămolului, adică 3 g/l. Nămolul activ trebuie aerat

**▼ M6**

în mod constant (de exemplu, 2 l/minut) la temperatura de testare și, dacă este posibil, trebuie utilizat în ziua colectării. Dacă acest lucru nu este posibil, nămolul trebuie alimentat zilnic cu apă uzată sintetică (50 ml de apă uzată sintetică/l de nămol activ) timp de încă două zile. Apoi nămolul este utilizat pentru test și rezultatele sunt acceptate ca fiind valabile, cu condiția să nu fi avut loc nicio modificare semnificativă a activității sale, evaluată prin intermediul vitezei de respirație heterotrofă endogenă și a vitezei de respirație legată de nitrificare.

29. În cazul în care pe parcursul incubației se produce spumă, pot apărea dificultăți în sensul că spuma și solidele din nămol pe care le conține se pot revărsa din vasele de aerare. Ocazional, formarea spumei poate fi cauzată pur și simplu de prezența apei uzate sintetice, însă, în cazul în care substanța chimică de testare conține un agent tensioactiv, acest fenomen trebuie anticipat. Pierderea solidelor din nămolul din amestecurile de testare va avea ca rezultat viteze de respirație reduse artificial care ar putea fi interpretate greșit ca rezultat al inhibării. În plus, aerarea soluției de agenți tensioactivi concentrează acești agenți în stratul de spumă; pierderea spumei din sistemul de testare va reduce concentrațiile de expunere. Formarea spumei poate fi ținută sub control prin metode mecanice simple (de exemplu, agitarea manuală ocazională cu ajutorul unei tije de sticlă) sau prin adăugarea unui agent antispumant pe bază de emulsie siliconată fără agenți tensioactivi și/sau utilizarea metodei de aerare prin agitarea flaconului. Dacă problema este legată de prezența apei uzate sintetice, compoziția apei uzate trebuie modificată prin adăugarea unui reactiv antispumant într-o proporție de 50 μl/l, de exemplu. Dacă formarea spumei este cauzată de substanța chimică de testare, trebuie determinată cantitatea necesară pentru topirea spumei la concentrația maximă de testare, după care fiecare dintre vasele de aerare trebuie tratate în mod identic (inclusiv cele în care nu există spumă, cum ar fi probele de control neutre și vasele de referință). Dacă se utilizează agenți antispumanti, nu trebuie să existe nicio reacție cu inoculul și/sau cu substanța chimică de testare.

**PROCEDURA DE TESTARE**

30. Poate fi determinată inhibarea a trei tipuri de consum de oxigen: total, exclusiv heterotrof și legat de nitrificare. În mod normal, este adecvată măsurarea inhibării consumului total de oxigen. Efectele asupra consumului heterotrof de oxigen din oxidarea carbonului organic și din oxidarea amoniului sunt necesare atunci când există o cerință specifică privind calcularea acestor două efecte distincte pentru o anumită substanță chimică sau (opțional) pentru a explica curbele doză-răspuns atipice rezultate din inhibarea consumului total de oxigen.

**Condițiile de testare**

31. Testul ar trebui efectuat la o temperatură de  $20 \pm 2$  °C.

**Amestecurile de testare**

32. Amestecurile de testare ( $F_T$  ca în tabelul 1) conținând apă, apă uzată sintetică și substanța chimică de testare se prepară astfel încât să se obțină diferite concentrații nominale ale substanței chimice de testare (a se vedea tabelul 1 pentru exemple de volum al constituenților). Dacă este necesar, pH-ul trebuie ajustat la  $7,5 \pm 0,5$ ; se diluează amestecurile cu apă și se adaugă inoculul pentru a obține volume finale egale în vase și pentru a începe aerarea.

**Amestecurile de referință**

33. Amestecurile ( $F_R$ ) trebuie preparate cu substanța chimică de referință, de exemplu 3,5-diclorfenol, în locul substanței chimice de testare, în același mod ca amestecurile de testare.

**▼ M6****Probele de control neutre**

34. Probele de control neutre ( $F_B$ ) ar trebui preparate la începutul și la sfârșitul perioadei de expunere pentru testele în care paharele de testare sunt pregătite secvențial la intervale regulate. În testele care utilizează echipamente care permit efectuarea de măsurători simultane ale consumului de oxigen, trebuie incluse cel puțin două probe de control neutre în fiecare lot de analiză simultană. Probele de control neutre conțin un volum egal de nămol activ și de mediu sintetic, însă nu conțin substanță chimică de testare sau de referință. Acestea trebuie diluate cu apă în același volum ca amestecurile de testare și de referință.

**Proba de control abiotică**

35. Dacă este necesar, de exemplu, dacă se știe sau se suspectează că o substanță chimică de testare are proprietăți reductoare puternice, trebuie preparat un amestec  $F_A$  pentru a măsura consumul abiotic de oxigen. Amestecul trebuie să conțină aceleași cantități de substanță chimică de testare și de apă uzată sintetică și același volum ca amestecurile de testare, însă fără nămol activ.

**Procedură generală și măsurători**

36. Amestecurile de testare, amestecurile de referință și probele de control neutre și abiotice se incubează la temperatura de testare în condiții de aerare forțată (0,5-1 l/min) pentru a păstra concentrația de oxigen dizolvat la o saturație de peste 60-70 % și pentru a menține flocoanele de nămol în suspensie. Agitarea culturilor este, de asemenea, necesară pentru a menține flocoanele de nămol în suspensie. Se consideră că incubarea începe odată cu contactul inițial dintre inoculul din nămolul activ și ceilalți constituenți ai amestecului final. La finalul incubării, după timpii de expunere specificați, în general de 3 ore, se extrag eșantioane pentru a măsura viteza de descădere a concentrației de oxigen dizolvat în celula destinată acestui scop (fig. 2 din apendicele 3) sau în vasul CBO umplut complet. Modul în care încep incubările depinde și de capacitatea echipamentelor utilizate de a măsura viteza consumului de oxigen. De exemplu, dacă echipamentul cuprinde o singură sondă de oxigen, măsurătorile se realizează individual. În acest caz, se prepară diferitele amestecuri necesare pentru testarea în apă uzată sintetică însă fără a adăuga inoculul, iar cantitățile de nămol necesare se adaugă în fiecare vas din serie. Incubările se încep pe rând la intervale de timp adecvate de 10-15 minute, de exemplu. În mod alternativ, sistemul de măsurare poate cuprinde mai multe sonde care facilitează măsurătorile simultane multiple; în acest caz, inoculul poate fi adăugat în același timp în grupurile de vase adecvate.
37. Concentrația nominală de nămol activ din toate amestecurile de testare, de referință și neutre (dar nu și din probele de control abiotice) este de 1,5 g/l de solide în suspensie. Consumul de oxigen se măsoară după 3 ore de expunere. Dacă este cazul, se realizează măsurători după 30 de minute de expunere suplimentară, conform descrierii de la punctul 5 de mai sus.

**Potențialul de nitrificare al nămolului**

38. Pentru a stabili dacă nămolul nitrifică și, în caz afirmativ, cu ce viteză, trebuie preparate amestecuri ( $F_B$ ) similare amestecurilor de control neutre și amestecuri „de control” suplimentare ( $F_N$ ), dar care conțin și N-alitioaree în concentrație de 11,6 mg/l. Amestecurile trebuie aerate și incubate la

**▼ M6**

20 °C ± 2 °C timp de 3 ore. Apoi trebuie măsurată viteza consumului de oxigen și trebuie calculată viteza consumului de oxigen legat de nitrificare.

**Protocoloale de test***Testul de stabilire a intervalului*

39. Atunci când este necesar, se utilizează un test preliminar pentru a estima intervalul concentrațiilor substanței chimice de testare necesare pentru un test final de determinare a inhibării consumului de oxigen. Alternativ, absența inhibării consumului de oxigen de către substanța chimică de testare într-un test preliminar poate demonstra inutilitatea unui test final, însă trebuie incluse triplicate la cea mai mare concentrație testată în testul preliminar (în general 1 000 mg/l, însă depinde de cerințele de date).

*Tabelul 1***Exemple de amestecuri pentru testul preliminar**

| Reactiv   | Concentrație originală                    |                 |                   |                   |                |
|---|---|-----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Soluție stoc a substanței chimice de testare                          | 10 g/l                                    |                 |                   |                   |                |
| Soluție stoc de mediu sintetic  | A se vedea punctul 16                     |                 |                   |                   |                |
| Suspensie stoc de nămol activ   | 3 g/l de solide în suspensie              |                 |                   |                   |                |
| Componente ale amestecurilor  | Doza din vasele de testare <sup>(a)</sup> |                 |                   |                   |                |
|   | F <sub>T1</sub>                           | F <sub>T2</sub> | F <sub>T3-5</sub> | F <sub>B1-2</sub> | F <sub>A</sub> |
| Soluție stoc a substanței chimice de testare (ml)<br>(punctele 19-21) | 0,5                                       | 5               | 50                | 0                 | 50             |
| Soluție stoc de apă uzată sintetică (ml)<br>(punctul 16)              | 16  | 16              | 16                | 16                | 16             |
| Suspensie de nămol activ (ml)<br>(punctele 26-29)                     | 250                                       | 250             | 250               | 250               | 0              |
| Apă<br>(punctul 15)   | 233,5                                     | 229             | 184               | 234               | 434            |
| Volumul total al amestecurilor (ml)                                   | 500                                       | 500             | 500               | 500               | 500            |
| Concentrațiile în amestec   |   |                 |                   |                   |                |
| Suspensie de testare (mg/l)<br>Nămol activ                            | 10  | 10              | 1 000             | 0                 | 1 000          |
| (solide în suspensie) (mg/l)  | 1 500                                     | 1 500           | 1 500             | 1 500             | 0              |

<sup>(a)</sup> Trebuie urmată aceeași procedură cu substanța chimică de referință pentru prepararea flacoanelor F<sub>R1-3</sub>

40. Testul trebuie efectuat utilizând cel puțin trei concentrații ale substanței chimice de testare, de exemplu, 10 mg/l, 100 mg/l și 1 000 mg/l cu o probă de control neutră și, dacă este necesar, cel puțin trei probe de control abiotice cu cea mai mare concentrație a substanței chimice de

▼ **M6**

testare (a se vedea drept exemplu tabelul 1). În mod ideal, concentrația cea mai scăzută nu ar trebui să aibă niciun efect asupra consumului de oxigen. Trebuie calculate vitezele de consum al oxigenului și viteza de nitrificare, dacă este relevantă; apoi se calculează procentajul de inhibare. În funcție de scopul testului, este de asemenea posibil să se determine doar toxicitatea unei concentrații-limită, de exemplu 1 000 mg/l. Dacă la această concentrație nu se produce niciun efect toxic semnificativ din punct de vedere statistic, nu mai sunt necesare alte teste la concentrații mai mari sau mai mici. Trebuie avut în vedere că substanțele puțin solubile în apă, amestecurile ale căror componente au solubilități diferite în apă și substanțele adsorbante trebuie cântărite direct în vasele de testare. În acest caz, volumul rezervat pentru soluția stoc de substanță de testare trebuie înlocuit cu apă de diluție.

*Testul definitiv***Inhibarea consumului total de oxigen**

41. Testul trebuie realizat utilizând un interval de concentrații dedus din testul preliminar. Pentru a obține atât o NOEC, cât și o  $EC_x$  (de exemplu  $EC_{50}$ ), se recomandă, în cele mai multe cazuri, șase probe de control și cinci concentrații de tratare într-o serie geometrică având cinci probe duplicate. Proba de control abiotică nu trebuie repetată dacă în testul preliminar nu a existat consum de oxigen, însă, în cazul în care are loc un consum semnificativ, trebuie incluse probe de control abiotice pentru fiecare concentrație a substanței chimice de testare. Sensibilitatea nămolului se verifică utilizând substanța chimică de referință 3,5-diclorofenol. Sensibilitatea nămolului se verifică pentru fiecare serie de testare, deoarece se știe că sensibilitatea fluctuează. În toate cazurile, se extrag eșantioane din vasele de testare după 3 ore sau după 30 de minute, dacă este necesar, pentru a măsura viteza consumului de oxigen din celula cu electrod de oxigen. Din datele colectate, se calculează vitezele de respirație specifice ale amestecurilor de control și de testare; ulterior se calculează procentajul de inhibare utilizând ecuația 7 de mai jos.

**Distincția dintre inhibarea respirației heterotrofe și nitrificare**

42. Utilizarea inhibitorului specific al nitrificării, ATU, permite evaluarea directă a efectelor inhibitorii ale substanțelor chimice de testare asupra oxidării heterotrofe, iar prin scăderea vitezei consumului de oxigen în prezența ATU din viteza de consum totală (fără ATU) pot fi calculate efectele asupra vitezei de nitrificare. Se prepară două seturi de amestecuri de reacție, conform protocoalelor de test pentru  $EC_x$  sau NOEC descrise la punctul 41, dar se adaugă ATU în fiecare amestec dintr-un set, la o concentrație finală de 11,6 mg/l, care s-a demonstrat că inhibă complet nitrificarea în nămolul cu concentrații de solide în suspensie de până la 3 000 mg/l (4). Vitezele consumului de oxigen trebuie măsurate după perioada de expunere; aceste valori directe reprezintă doar respirația heterotrofă, iar diferențele dintre acestea și vitezele de respirație totale corespunzătoare reprezintă nitrificarea. Se calculează apoi diferențele grade de inhibare.

**Măsurători**

43. După perioada (perioadele) de expunere, un eșantion din primul vas de aerare trebuie transferat în celula cu electrod de oxigen (fig. 1 din apendicele 2), iar concentrația oxigenului dizolvat trebuie măsurată imediat. Dacă este disponibil un sistem cu mai mulți electrozi, măsurătorile se pot efectua simultan. Este esențială agitarea (cu ajutorul unui magnet acoperit) la aceeași viteză utilizată pentru calibrarea electrodului pentru a asigura faptul că sonda răspunde cu întârziere minimă la variațiile de concentrație a oxigenului și pentru a garanta regularitatea și reproductibilitatea măsurătorilor în vasul de măsurare. În general este adecvat sistemul cu sondă

**▼ M6**

autoagitatoare format din câțiva electrozi de oxigen. Între măsurători, celula trebuie clătită cu apă. Alternativ, eșantionul poate fi folosit pentru umplerea unui vas CBO (fig. 2 din appendicele 3) prevăzut cu un agitator magnetic. Apoi trebuie introdusă o sondă de oxigen cu adaptor de tip manșon în gâtul vasului și trebuie pornit agitatorul magnetic. În ambele cazuri, concentrația de oxigen dizolvat trebuie măsurată în mod continuu și înregistrată pentru o anumită perioadă, de obicei 5-10 minute, sau până când concentrația de oxigen scade sub 2 mg/l. Electrocul trebuie scos, amestecul trebuie turnat înapoi în vasul de aerare, continuând aerarea și agitarea, în cazul în care este necesară măsurarea după o perioadă mai lungă de expunere.

**Verificarea concentrației substanței chimice de testare**

44. Pentru anumite scopuri, poate fi necesară măsurarea concentrației substanței chimice de testare în vasele de testare. Trebuie avut în vedere că dacă se utilizează soluții stoc de:

- substanțe puțin solubile în apă;
- amestecuri ale căror componente au diferite solubilități în apă; sau
- substanțe cu solubilitate bună în apă, dar în cazul cărora concentrația soluției stoc este aproape de solubilitatea maximă în apă,

fracțiunea dizolvată nu se cunoaște, iar concentrația reală a substanței chimice de testare transferate în vasele de testare rămâne necunoscută. Pentru a caracteriza expunerea, este necesară o estimare analitică a concentrațiilor substanței chimice de testare în vasele de testare. Pentru a simplifica lucrurile, estimarea analitică trebuie făcută înainte de a adăuga inoculul. Din cauza faptului că numai fracțiunile dizolvate vor fi transferate în vasele de testare, concentrațiile măsurate pot fi foarte scăzute.

45. Pentru a evita analizele îndelungate și costisitoare, se recomandă simpla cântărire a substanței chimice de testare direct în vasele de testare și utilizarea concentrației nominale inițiale corespunzătoare acestei mase ca referință pentru calculele ulterioare. Nu este necesară o distincție între fracțiunile dizolvată, nedizolvată sau adsorbită ale substanței chimice, deoarece toate aceste fracțiuni apar și în condiții normale în stația de epurare a apelor uzate și pot varia în funcție de compoziția apelor uzate. Obiectivul acestei metode de testare este de a obține o estimare realistă a concentrației neinhbitoare și nu este adecvată pentru a studia în detaliu fracțiunile care contribuie la inhibarea organismelor din nămolul activ. În final, ar trebui cântărite direct în vasele de testare și substanțele adsorbante, iar vasele trebuie silanizate pentru a reduce la minimum pierderile prin adsorbție.

**DATE ȘI RAPORT****Calculul vitezelor consumului de oxigen**

46. Vitezele consumului de oxigen se calculează pornind de la media valorilor măsurate, de exemplu, pornind de la partea liniară a graficelor concentrației oxigenului în funcție de timp, limitând calculele la concentrațiile oxigenului cuprinse între 2,0 mg/l și 7,0 mg/l, întrucât concentrațiile mai mari și mai mici pot influența vitezele de consum. Incursiunea în benzile de concentrație superioare sau inferioare acestor valori este uneori inevitabilă și necesară, de



▼ **M6**

exemplu, atunci când respirația este puternic inhibată și prin urmare foarte lentă sau dacă un anumit nămol activ respiră foarte repede. Acest demers este acceptabil cu condiția ca secțiunile extinse ale graficului de viteză să fie drepte, iar gradientii să nu se modifice atât timp cât traversează limitele de 2,0 mg/l sau 7,0 mg/l O<sub>2</sub>. Orice secțiune curbată a graficului indică faptul că sistemul de măsurare se stabilizează sau că viteza de consum se modifică și nu ar trebui utilizate pentru calcularea vitezelor de respirație. Viteza consumului de oxigen trebuie exprimată în miligrame per litru pe oră (mg/lh) sau în miligrame per gram de nămol uscat pe oră (mg/gh). Viteza consumului de oxigen, R, în mg/lh, poate fi calculată sau interpolată plecând de la partea liniară a graficului de descreștere a cantității de oxigen în conformitate cu ecuația 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad (1)$$

unde:

Q<sub>1</sub> este concentrația de oxigen la începutul secțiunii selectate a fazei liniare (mg/l);

Q<sub>2</sub> este concentrația de oxigen la finalul secțiunii selectate a fazei liniare (mg/l);

Δ<sub>t</sub> este intervalul de timp dintre aceste două măsurători (min.).

47. Viteza de respirație specifică (R<sub>s</sub>) este exprimată ca fiind cantitatea de oxigen consumată per g de masă uscată de nămol pe oră (mg/gh) în conformitate cu ecuația 2:

$$R_s = R/SS \quad (2)$$

unde SS este concentrația de solide în suspensie din amestecul de testare (g/l).

48. Diferenții indici ai R care pot fi combinați sunt:

S viteza specifică

T viteza de respirație totală

N viteza de respirație legată de nitrificare

H viteza de respirație heterotrofă

A viteza corespunzătoare proceselor abiotice

B viteza pe baza determinărilor pe probe de control neutre (medie)

**Calculul vitezei consumului de oxigen legat de nitrificare**

49. Relația dintre respirația totală (R<sub>T</sub>), respirația legată de nitrificare (R<sub>N</sub>) și respirația heterotrofă (R<sub>H</sub>) se obține din ecuația 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

unde:

R<sub>N</sub> este viteza consumului de oxigen legat de nitrificare (mg/lh);

R<sub>T</sub> este viteza măsurată a consumului de oxigen al probei de control neutre (fără ATU; F<sub>B</sub>) (mg/lh).

R<sub>H</sub> este viteza măsurată a consumului de oxigen al probei de control neutre cu ATU (F<sub>N</sub>) (mg/lh).

**▼ M6**

50. Această relație este valabilă pentru valorile probelor de control neutre ( $R_{NB}$ ,  $R_{TB}$ ,  $R_{HB}$ ), probele de control abiotice ( $R_{NA}$ ,  $R_{TA}$ ,  $R_{HA}$ ) și determinările cu substanțele chimice de testare ( $R_{NS}$ ,  $R_{TS}$ ,  $R_{HS}$ ) (mg/gh). Vitezele de respirație specifice se calculează pornind de la:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Dacă  $R_N$  este nesemnificativă (de exemplu  $< 5\%$  din  $R_T$  a probelor de control neutre) într-un test preliminar, se poate presupune că consumul de oxigen heterotrof este egal cu consumul total și că nu se produce nitrificare. Dacă testele trebuie să țină cont de efectele asupra microorganismelor heterotrofe și nitrificante, este necesară o altă sursă de nămol activ. Dacă există dovezi ale unor viteze ale consumului de oxigen inhibitate cu diferite concentrații ale substanței chimice de testare, se realizează un test final.

**Calculul procentajului de inhibare**

52. Procentajul de inhibare,  $I_T$ , a consumului total de oxigen la fiecare concentrație a substanței chimice de testare se obține din ecuația 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\% \quad (7)$$

53. În mod similar, procentajul de inhibare a consumului heterotrof de oxigen,  $I_H$ , la fiecare concentrație a substanței chimice de testare se obține din ecuația 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\% \quad (8)$$

54. În final, inhibarea consumului de oxigen legat de nitrificare,  $I_N$ , la fiecare concentrație se obține din ecuația 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\% \quad (9)$$

55. Procentajul de inhibare a consumului de oxigen se reprezintă grafic în funcție de logaritmul concentrației substanței chimice de testare (curba inhibării, a se vedea fig. 3 din apendicele 4). Curbele inhibării se reprezintă grafic pentru fiecare perioadă de aerare de 3 ore sau de 3 ore și 30 de minute. Concentrația substanței chimice de testare care inhibă consumul de oxigen cu 50 % ( $EC_{50}$ ) trebuie calculată sau interpolată din grafic. Dacă sunt disponibile date adecvate, se pot calcula sau interpola limitele de încredere de 95 % ale  $EC_{50}$ , panta curbei și valorile adecvate pentru a reprezenta începutul inhibării (de exemplu,  $EC_{10}$  sau  $EC_{20}$ ) și finalul intervalului de inhibare (de exemplu,  $EC_{80}$  sau  $EC_{90}$ ).
56. Trebuie avut în vedere că din cauza variabilității rezultatelor observate adesea, în multe cazuri poate fi suficientă exprimarea suplimentată a rezultatelor în ordinul de mărime, de exemplu:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ între } 1 \text{ mg/l și } 10 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ între } 10 \text{ mg/l și } 100 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

**Interpretarea rezultatelor**

$EC_x$

▼ **M6**

57. Valorile  $EC_x$ , inclusiv limitele de încredere de 95 % inferioare și superioare corespunzătoare parametrului se calculează utilizând metodele statistice adecvate [de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Kärber sau simpla interpolare (11)]. O valoare  $EC_x$  se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu  $x$  % din media etaloanelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii  $EC_{50}$  sau a unei alte valori  $EC_x$ , mediile per tratament ( $x$ ) trebuie supuse unei analize de regresie.

*Estimarea NOEC*

58. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice adecvate conform Documentului OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (11). În general, efectele adverse ale substanței chimice de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la  $p \leq 0,05$ .

**Raportul de testare**

59. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

*Substanța chimică de testare*

- denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, puritatea;
- proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare [de exemplu,  $\log K_{ow}$ , solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și posibile informații privind transformarea substanței chimice de testare, de exemplu, adsorbția în nămolul activ).

*Sistemul de testare*

- sursa, condițiile de funcționare a stației de tratare a apelor uzate și afluenții pe care îi primește, concentrația, pretratarea și întreținerea nămolului activ.

*Condițiile de testare*

- temperatura de testare, pH-ul pe parcursul testului și durata fazei (fazelor) de expunere.

*Rezultatele*

- consumul specific de oxigen al probelor de control [ $\text{mg O}_2/(\text{g nămol} \times \text{h})$ ];
- toate datele măsurate, curba (curbele) inhibării și metoda de calcul al  $EC_{50}$ ;
- $EC_{50}$  și, dacă este posibil, limitele de încredere de 95 %, eventual  $EC_{20}$ ,  $EC_{80}$ , eventual NOEC și metodele statistice utilizate, în cazul în care nu se poate determina  $EC_{50}$ ;
- rezultatele pentru inhibarea totală și, dacă este cazul, pentru inhibarea heterotrofă și legată de nitrificare;
- consumul abiotic de oxigen în proba de control fizico-chimică (dacă se utilizează);
- denumirea substanței chimice de referință și rezultatele cu această substanță chimică;
- toate observațiile și abaterile de la procedura standard care ar fi putut influența rezultatul.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. și Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼ **M6**

- (2) King, E. F. și Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
- (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.
- (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
- (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
- (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
- (10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.
- (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

**▼ M6***Apendicele 1***Definiții**

În cadrul prezentei metode de testare se aplică următoarele definiții.

**„Substanță chimică”** înseamnă o substanță sau un amestec.

**„EC<sub>x</sub> (concentrație efectivă pentru un efect de x %)”** înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC<sub>50</sub> reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite.

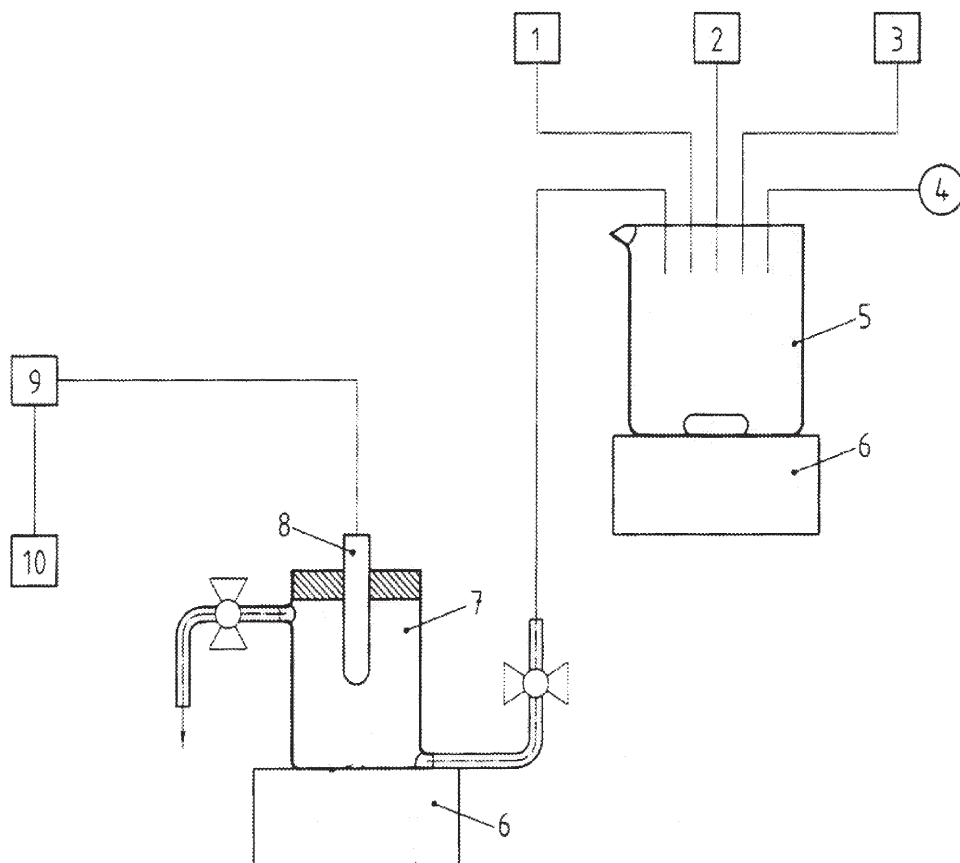
**„NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect)”** înseamnă concentrația substanței chimice de testare în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

**„Substanță chimică de testare”** înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

▼ **M6**

## Apendicele 2

Fig. 1: Exemple de unitate de măsură



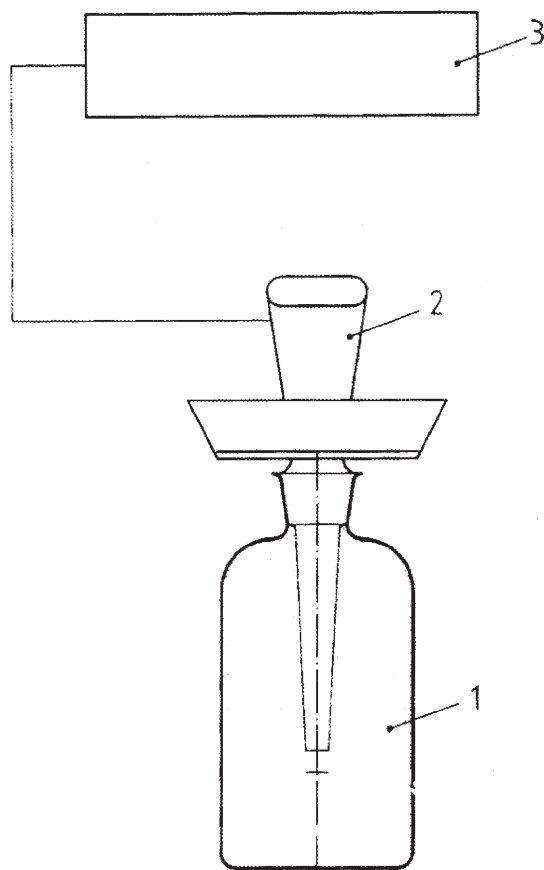
## Legendă

- |                                |                                       |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1 nămol activ                  | 6 agitator magnetic                   |
| 2 mediu sintetic               | 7 celulă de măsurare a oxigenului     |
| 3 substanță chimică de testare | 8 electrod de oxigen                  |
| 4 aer                          | 9 instrument de măsurare a oxigenului |
| 5 vas de amestecare            | 10 înregistrator                      |

▼ **M6**

## Apendicele 3

Fig. 2: Exemplu de unitate de măsură, utilizând un vas CBO

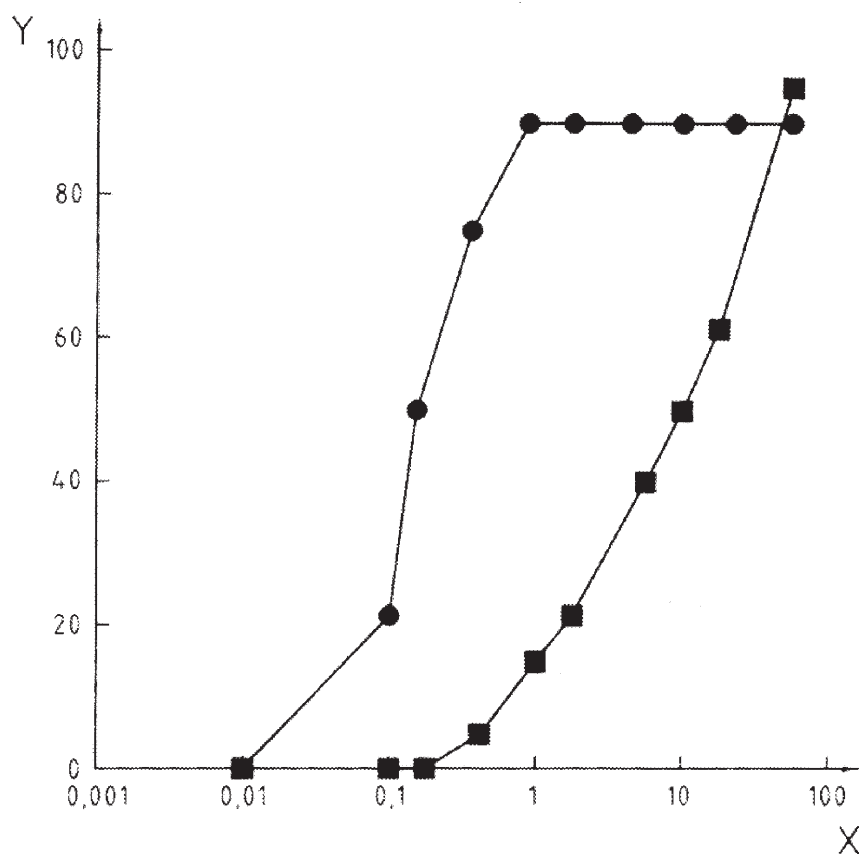
*Legendă*

- 1 Vas de testare
- 2 Electrode de oxigen
- 3 Instrument de măsurare a oxigenului

▼ **M6**

## Apendicele 4

Fig. 3: Exemplu de curbă de inhibare



## Legendă

X concentrația 3,5-diclorofenolului (mg/l)

Y inhibarea ( %)

■ respirația heterotrofă din timpul inhibării utilizând un nămol nitrifiant

● nitrificarea din timpul inhibării utilizând un nămol nitrifiant.





## C.12. BIODEGRADARE

### TESTUL SCAS MODIFICAT

#### 1. METODĂ

##### 1.1. INTRODUCERE

Scopul metodei este evaluarea biodegradabilității totale potențiale a substanțelor organice nevolatile și solubile în apă, când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme pe o perioadă lungă de timp. Viabilitatea microorganismelor se menține pe această perioadă prin aport zilnic de apă uzată decantată (pentru condițiile de sfârșit de săptămână, apa poate fi păstrată la 4 °C. Alternativ, se poate folosi apă uzată sintetică din testul de confirmare OCDE).

Poate avea loc adsorbția fizico-chimică pe materiile solide în suspensie, acest lucru trebuind luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea punctul 3.2.).

Datorită perioadei de păstrare îndelungată a fazei apoase (36 de ore) și adăugării intermitente a substanțelor nutritive, testul nu simulează condițiile din mediul natural în stația de epurare a apei uzate. Rezultatele obținute cu diferite substanțe de testat arată că testul are un potențial mare de evaluare a biodegradabilității.

Condițiile prevăzute de test sunt extrem de favorabile selecției și/sau adaptării microorganismelor capabile să degradeze compusul de testare. (Procedura poate fi folosită și pentru a produce inoculi aclimatizați pentru utilizare în alte teste.)

În această metodă, măsurarea concentrației carbonului organic dizolvat se folosește pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanțelor de testat. Este preferabil să se determine COD după acidificare și purjare, nu ca diferență între  $C_{\text{total}} - C_{\text{anorganic}}$

Utilizarea simultană a metodei analitice specifice poate permite evaluarea biodegradării primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda se aplică numai pentru substanțele organice care, la concentrația folosită în test:

- sunt solubile în apă (cel puțin 20 mg carbon organic dizolvat/litru);
- au presiunea vaporilor neglijabilă;
- nu sunt inhibitoare pentru bacterii;
- nu se adsorb semnificativ în sistemul de testare;
- nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Trebuie stabilit conținutul de carbon organic al compusului testat.

**▼B**

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale substanței de testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru alegerea unor concentrații adecvate de testare.

## 1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

$C_T$  = concentrația substanței de testat, exprimată în carbon organic prezent sau adăugat în apa uzată decantată la începutul perioadei de aerare (mg/l);

$C_t$  = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției testate la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l);

$C_c$  = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției de control la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l).

Biodegradarea se definește în această metodă ca fiind dispariția carbonului organic. Biodegradarea poate fi exprimată ca:

1. Procentul de eliminare  $D_{da}$  al cantității de substanță adăugată zilnic:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \quad [1]$$

unde:

$D_{da}$  = degradare/adaos zilnic.

2. Procentul de eliminare  $D_{ssd}$  a cantității de substanță prezente la începutul fiecărei zile:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

unde

$D_{ssd}$  = degradare/substanță la începutul zilei;

indicii  $i$  și  $(i + 1)$  se referă la ziua măsurării.

Se recomandă ecuația 2(a) dacă COD al efluentului variază de la zi la zi, în timp ce ecuația 2(b) se poate folosi când COD al efluentului rămâne relativ constant de la zi la zi.

**▼B****1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

În unele cazuri, când se studiază o substanță nouă, pot fi utile substanțele de referință; cu toate acestea, nu se recomandă aici nicio substanță de referință specifică.

Datele despre mai mulți compuși evaluați în testele de comparație interlaboratoare (a se vedea apendicele 1) se prezintă în principal pentru a permite calibrarea periodică acestei metode și compararea rezultatelor dacă se folosește altă metodă.

**1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Nămolul activ din instalația de tratare a apei uzate se introduce într-o instalație de tratare cu nămol activ cu alimentare semicontinuă (SCAS). Se adaugă substanța de testat și apa uzată menajeră decantată, iar amestecul se aerează 23 de ore. Aerarea este apoi oprită, nămolul se lasă să se decanteze și se elimină supernatantul.

Nămolul care rămâne în vasul de aerare se amestecă apoi cu o parte din substanța de testat și de apă uzată, iar ciclul se repetă.

Biodegradarea se evaluează prin determinarea conținutului de carbon organic dizolvat în soluția de supernatant. Valoarea obținută se compară cu cea găsită pentru soluția dintr-un tub martor alimentat numai cu apă uzată decantată.

Dacă se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările din concentrația moleculei inițiale care se datorează biodegradării (biodegradabilitate primară).

**1.5. CRITERII DE CALITATE**

Nu s-a stabilit încă reproductibilitatea prezentei metode bazate pe eliminarea carbonului organic dizolvat. (Dacă se ia în considerare biodegradarea primară, se obțin date foarte exacte pentru substanțele care sunt foarte degradate).

Sensibilitatea acestei metode este determinată în mare parte de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și de nivelul substanței de testat în soluție la începutul fiecărui ciclu.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Pregătire**

Se folosește un număr suficient de unități de aerare curate, alternativ cu unitatea originală de testare SCAS de 1,5 l și se montează tuburile de intrare a aerului (figura 1) pentru fiecare substanță testată și proba martor. Aerul comprimat care pătrunde în unitățile de testare, purificat printr-un filtru de vată hidrofilă, nu trebuie să conțină carbon organic și să fie deja saturat cu apă pentru a se reduce pierderile prin evaporare.

Se prelevează o probă de soluție mixtă ce conține 1-4 g materii solide în suspensie pe litru din stația de epurare a apei uzate cu nămol activ. Sunt necesari aproximativ 150 ml de soluție omogenă pentru fiecare instalație de aerare.

**▼B**

Soluțiile mamă se prepară cu apă distilată; în mod normal, concentrația necesară este de 400 mg/l exprimată în carbon organic, ceea ce dă o concentrație a substanței de testat de 20 mg/l carbon la începutul fiecărui ciclu de aerare, dacă nu se produce nicio biodegradare.

Sunt acceptabile concentrații mai mari dacă toxicitatea față de microorganisme permite acest lucru.

Se măsoară conținutul în carbon organic al soluțiilor mamă.

#### 1.6.2. *Condiții de testare*

Testul trebuie realizat la 20-25 °C.

Se folosește o concentrație mare de microorganisme aerobe (1-4 g/l materii solide în suspensie), iar perioada de păstrare efectivă este de 36 ore. Carbonul organic din efluentul uzat este, în mod normal, oxidat puternic după 8 ore după începerea fiecărui ciclu de aerare. Apoi, nămolul respiră endogen în perioada rămasă de aerare, timp în care singurul substrat disponibil este substanța de testat, dacă aceasta nu se metabolizează ușor. Aceste caracteristici, combinate cu reînoularea zilnică a soluției de testat, dacă se folosește apă de uzată menajeră ca mediu, oferă condiții favorabile atât pentru aclimatizare, cât și pentru o biodegradare rapidă.

#### 1.6.3. *Desfășurarea testului*

Se prelevează o probă de soluție omogenă din instalația de epurare a apei predominant menajere cu nămol activ sau dintr-o unitate de laborator și se păstrează în condiții aerobe până la folosirea în laborator. Fiecare unitate de aerare, precum și unitatea martor, se umple cu 150 ml de soluție omogenă (dacă se folosește unitatea de testare originală SCAS, volumele date se înmulțesc cu 10) și începe aerarea. După 23 de ore aerarea se oprește, iar nămolul se lasă să se decanteze timp de 45 de minute. Se deschide pe rând robinetul fiecărui recipient și se extrag 100 ml din supernatant. Se prelevează o probă de apă uzată menajeră decantată, imediat înainte de utilizare, și se adaugă 100 ml la nămolul rămas în fiecare unitate de aerare. Aerarea se pornește din nou. În această fază nu se adaugă nicio substanță de testat, iar unitățile se alimentează zilnic cu apă uzată menajeră până când la decantare se obține un supernatant limpede. De obicei, aceasta poate să dureze 2 săptămâni, timp în care carbonul organic dizolvat în supernatant, la sfârșitul fiecărui ciclu de aerare, se apropie de o valoare constantă.

La sfârșitul acestei perioade, nămolurile decantate individual se amestecă și se adaugă în fiecare unitate câte 50 ml din nămolul compozit rezultat.

În unitățile martor se adaugă 95 ml apă uzată decantată și 5 ml de apă, iar în unitățile de testare se adaugă 95 ml de apă uzată decantată și 5 ml de soluție mamă a substanței de testat corespunzătoare (400 mg/l). Aerarea începe din nou și continuă 23 de ore. Nămolul se lasă să se decanteze 45 minute, se scoate supernatantul și se analizează conținutul de carbon organic dizolvat.

Procedul de mai sus, de umplere și scoatere, se repetă zilnic, pe toată perioada testului.

**▼B**

Înainte de decantare, poate fi necesară curățarea pereților unităților pentru a preveni acumularea de materii solide peste nivelul lichidului. Se folosește o racletă sau o perie pentru fiecare unitate, pentru a preveni contaminarea.

Ideal este să se determine zilnic conținutul de carbon organic dizolvat în supernatant. Înainte de analiză, soluțiile se filtrează prin filtre cu membrană de 0,45 μm, se spală sau se centrifughează. Filtrele cu membrană sunt acceptabile dacă se asigură că nu are loc nici eliminare de carbon, nici absorbție de substanță în faza de filtrare. Temperatura probei nu trebuie să depășească 40 °C când aceasta este în centrifugă.

Durata testului pentru substanțele care prezintă biodegradare scăzută sau nulă este nedeterminată, dar experiența arată că aceasta trebuie să fie de cel puțin 12 săptămâni, în general, dar nu mai mult de 26 săptămâni.

## 2. **DATE ȘI EVALUARE**

Valorile masei de carbon organic dizolvat în soluțiile de supernatant din unitățile de testare și din unitățile martor sunt reprezentate grafic în funcție de timp.

Pe măsură ce se realizează biodegradarea, nivelul constatat la testare se apropie de cel din proba martor. Când se constată că diferența dintre cele două niveluri este constantă la trei măsurări consecutive, se efectuează un număr suficient de măsurări suplimentare, pentru a permite interpretarea statistică a datelor și calcularea procentului de biodegradare al substanței de testat ( $D_{da}$  sau  $D_{ssd}$ , a se vedea punctul 1.2).

## 3. **RAPORT**

### 3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

- toate informațiile despre tipul de apă uzată, tipul de unități folosite și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință (dacă s-a folosit) și proba martor;
- temperatura;
- curba de eliminare cu descriere și mod de calcul (a se vedea punctul 1.2);
- data și locul unde au fost prelevate probele de nămol activ și apă uzată, starea adaptării, concentrația etc.;
- argumentele științifice pentru eventualele modificări ale metodei de testare;
- semnătura și data.

**▼B****3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Deoarece substanța care urmează să fie testată prin această metodă nu este ușor biodegradabilă, orice eliminare a COD datorată numai biodegradării este în mod normal treptată, în zile sau săptămâni, cu excepția cazurilor în care aclimatizarea este bruscă, așa cum indică dispariția bruscă care se petrece după câteva săptămâni.

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate juca uneori un rol important; acesta se manifestă prin eliminarea completă sau parțială a COD-ului adăugat de la început. Ceea ce se întâmplă ulterior depinde de factori cum ar fi gradul de absorbție și concentrația materiilor solide în suspensie în efluentul eliminat. De obicei, diferența dintre concentrația COD în soluția martor și în supernatantul de testare crește treptat de la valoarea inițială redusă, această diferență rămânând apoi la noua valoare în restul experimentului, dacă nu are loc aclimatizarea.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste ulterioare. În acest scop există mai multe metode, cea mai convingătoare fiind utilizarea supernatantului sau a nămolului ca inocul într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care dau valori mari de eliminare de COD neadsorbit în acest test trebuie considerate ca posibil biodegradabile. Eliminarea parțială neadsorbtivă arată că substanța chimică este supusă cel puțin unei degradări parțiale.

Eliminările reduse sau nule ale COD se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat și acest lucru poate fi dovedit prin liză și pierderea nămolului, rezultând supernatanți tulburi. Testul trebuie repetat folosindu-se o concentrație mai scăzută de substanță testată.

Utilizarea unei metode analitice specifice sau a unei substanțe de testat marcate cu  $^{14}\text{C}$  permite o sensibilitate mai mare. În cazul substanței de testat cu  $^{14}\text{C}$ , recuperarea  $^{14}\text{CO}_2$  va confirma că biodegradarea s-a produs.

În cazul în care rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, este necesar să se dea, în măsura în care este posibil, explicații cu privire la modificarea structurii chimice care duce la pierderea răspunsului substanței de testat inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut în mediului testului martor.

**4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

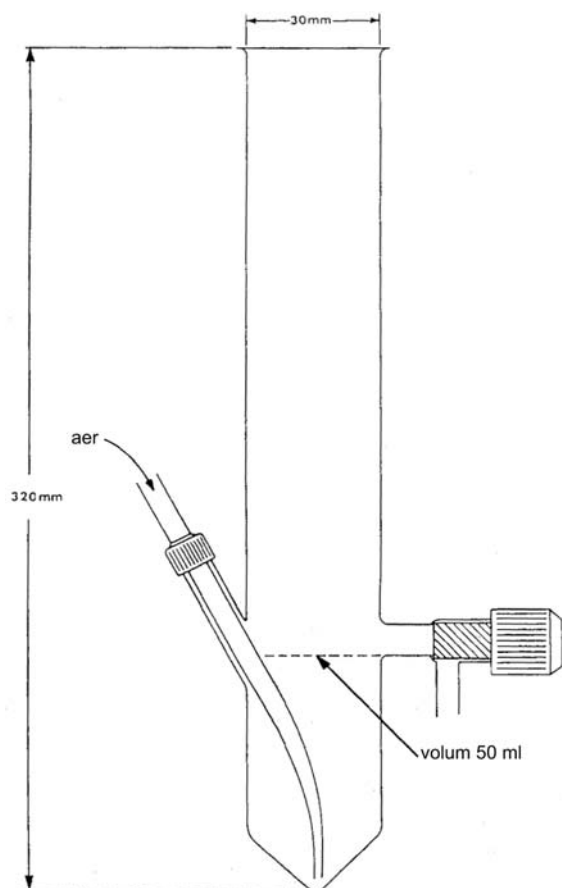
1. OCDE, Paris, 1981, Linii directoare privind testele 302 A, Decizia Consiliului C(81) 30 final.



*Apendicele 1*

**Test SCAS: Exemple de rezultate**

| Substanță                      | $C_T$<br>(mg/l) | $C_t - C_c$<br>(mg/l) | Procent de<br>biodegradare<br>$D_{da}$ | Durata testului<br>(zile) |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------|--|---------------------------|
| 4-acetil aminobenzen sulfonat  | 17,2            | 2,0                   | 85                                     | 40                        |
| Tetra-propilen benzen sulfonat | 17,3            | 8,4                   | 51,4                                   | 40                        |
| 4-nitrofenol                   | 16,9            | 0,8                   | 95,3                                   | 40                        |
| Dietilen glicol                | 16,5            | 0,2                   | 98,8                                   | 40                        |
| Anilină                        | 16,9            | 1,7                   | 95,9                                   | 40                        |
| Ciclopentan tetra carboxilat   | 16,9            | 3,2                   | 81,1                                   | 120                       |

**▼B***Apendicele 2***Exemplu de aparatură de testare**



**▼B****C.13. BIOCONCENTRAREA: EXPERIENȚA CU REÎNNOIRE  
CONTINUĂ ASUPRA PEȘTELOR****1. METODĂ**

Prezenta metodă de bioconcentrare reproduce Orientarea 305 (1996) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Prezenta metodă descrie o procedură de caracterizare a potențialului de bioconcentrare, în cazul peștilor supuși la o reînnoire continuă a anumitor substanțe. Regimurile experimentale cu reînnoire continuă sunt de departe preferate, dar și cele semistatice sunt acceptate, în măsura în care sunt îndeplinite criteriile de validitate.

Metoda oferă toate informațiile necesare executării experimentului, însă lasă libertatea indispensabilă de adaptare a conceptului experimental, la condițiile specifice fiecărui laborator și nu impune în mod strict, caracteristicile substanțelor testate. În special, sunt indicate produsele organice stabile, pentru care valorile  $\log P_{ow}$  sunt cuprinse între 1,5 și 6,0 (1), însă metoda este aplicabilă și substanțelor superlipofile ( $\log P_{ow} > 6,0$ ). Pentru acestea din urmă, estimarea prealabilă a factorului de bioconcentrare (BCF), denumit uneori  $K_B$ , va fi probabil superioară valorii factorului de bioconcentrare în starea staționară ( $BCF_{SS}$ ), la care ne putem aștepta în cazul unei experiențe de laborator. Evaluările preliminare ale factorului de bioconcentrare, pentru produsele organice ale căror valori  $\log P_{ow}$  ajung până la aproximativ 9,0 pot fi calculate cu ajutorul ecuației Bintein *et al* (2). Potențialul de bioconcentrare se caracterizează pentru anumiți parametri, cum ar fi: constanta de viteză de absorbție ( $k_1$ ), constanta de viteză de eliminare ( $k_2$ ) și  $BCF_{SS}$ .

Substanțele experimentale marcate radioactiv pot facilita analiza eșantioanelor de apă și de pești; de asemenea, pot servi la definirea degradării, dacă este necesar să o identificăm și să o cuantificăm. Dacă se măsoară totalul de reziduu radioactiv (de exemplu, prin combustia ori solubilizarea țesuturilor), BCF se bazează pe compusul de origine, toți metaboliții reținuți și carbonul asimilat. Factorii BCF care se bazează pe reziduurile radioactive totale nu pot fi, așadar, comparați direct cu un factor BCF derivat dintr-o analiză chimică particulară exclusiv a compusului de origine.

Pot fi utilizate proceduri de epurare, în cadrul studiilor cu markeri radioactivi, pentru determinarea BCF pe baza compusului original, iar principalii metaboliți vor fi determinați dacă se consideră necesar. De asemenea, există posibilitatea combinării unui studiu de metabolism al peștilor, cu un studiu de bioconcentrare, prin analiza și identificarea reziduurilor tisulare.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

*Bioconcentrare/Bioacumulare*: creșterea concentrației substanței testate la un sau într-un organism (țesuturile specifice ale acestuia) în raport cu concentrația acestei substanțe în mediul ambiant.

*Factor de bioconcentrare* (BCF sau  $K_B$ ): în orice moment din faza de absorbție a experienței de acumulare, concentrația substanței testate la/în pești, sau pe țesuturi determinate ale acestora, [ $C_f$  în  $\mu\text{g/g}$  (ppm)] raportată la concentrația substanței chimice din mediul ambiant [ $C_w$  în  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)].

## ▼B

*Factor de bioconcentrare în stare staționară* ( $BCF_{ss}$  sau  $K_B$ ): nu se modifică prea mult într-o perioadă mare de timp, concentrația substanței experimentale din mediul ambiant fiind constantă pentru aceeași perioadă de timp.

*Platoul sau starea staționară*: în reprezentarea grafică a substanței experimentale la pești ( $C_f$ ), în funcție de timp, este de așteptat pentru curbă să devieze paralel față de axa timpului, iar pentru trei analize succesive ale  $C_f$  – realizate asupra unor eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile – să rămână într-o plajă de 20 % una față de alta; nu există diferențe semnificative între cele trei perioade de eșantionare. Când se analizează eșantioane reunite, se efectuează minimum patru analize succesive. Dacă substanțele experimentale au caracteristici de absorbție lente, este preferabil să se opteze pentru intervale săptămânale.

*Factori de bioconcentrare*: se calculează direct, plecând de la constantele cinetice ( $k_1/k_2$ ); se numesc factori de concentrare cinetică  $BCF_k$ .

*Coeeficient de partiție octanol-apă* ( $P_{ow}$ ): raportul de solubilitate a unui produs chimic în n-octanol și în apă, la echilibru (Metoda A.8), de asemenea desemnat prin  $K_{ow}$ . Logaritmul lui  $P_{ow}$  indică potențialul de bioconcentrare al unui produs chimic în organismele acvatice.

*Faza de expunere sau de absorbție*: timpul în care peștii sunt expuși la produsul chimic testat.

*Constanta de viteză de absorbție* ( $k_1$ ): valoare numerică ce definește viteza de creștere a concentrației substanței testate la/în pești (sau în țesuturile specifice ale acestora), atunci când sunt expuși la acea substanță chimică ( $k_1$  este exprimată în zile<sup>-1</sup>).

*Faza de post-expunere sau de eliminare (pierdere)*: ca urmare a transferării peștilor dintr-un mediu care conține substanța testată, într-un mediu care nu conține acea substanță, timp în care eliminarea (sau pierderea netă) de substanță de către pești (sau de către țesuturile specifice) este studiată.

*Constanta de viteză de eliminare (pierdere)* ( $k_2$ ): valoare numerică ce definește viteza de scădere a concentrației substanței testate la/în pești (sau în țesuturile specifice ale acestora), ca urmare a transferării lor dintr-un mediu care conține substanța testată, într-un mediu care nu conține acea substanță ( $k_2$  este exprimată în zile<sup>-1</sup>).

### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Experimentul se împarte în două faze: faza de expunere (absorbție) și de post-expunere (eliminare). În cursul fazei de absorbție, grupele separate de pești dintr-o specie sunt supuse la cel puțin două concentrații ale substanței totale. Apoi, aceștia sunt transferați într-un mediu care nu conține respectiva substanță, pentru faza de eliminare. Aceasta din urmă este întotdeauna necesară, în afară de cazul în care absorbția substanței în timpul fazei de absorbție a fost nesemnificativă (de exemplu, dacă  $BCF$  este mai mic de 10). Concentrația substanței testate la/în pești (sau în țesuturile specificate ale acestora) este urmărită de-a lungul celor două faze ale experimentului. În afară de cele două concentrații experimentale, un grup martor de pești este menținut în condiții identice, cu excepția substanței testate, care este absentă. Acest lucru este necesar pentru stabilirea eventualelor relații între efectele nefaste observate la testul de bioconcentrare și acest grup martor, precum și pentru deducerea concentrației de bază a substanței testate.

**▼B**

Faza de absorbție durează 28 de zile, în cazul în care nu se demonstrează mai devreme că a fost atins echilibrul. Se poate estima durata fazei de absorbție și timpul necesar pentru obținerea stării staționare, cu ajutorul ecuațiilor din apendicele 3. Perioada de epurare începe așadar, cu transferarea peștilor în alt recipient curat, conținând același mediu, cu excepția substanței testate. Atunci când devine posibil, se calculează factorul de bioconcentrare, de preferință sub formă de raport ( $BCF_{ss}$ ) de concentrație de pești ( $C_f$ ) și în apă ( $C_w$ ), în starea de echilibru aparent și în calitate de factor de bioconcentrare cinetică; și  $BCF_k$  ca raport al constantelor de viteză de absorbție ( $k_1$ ) și de epurare ( $k_2$ ), considerând o cinetică de ordinul întâi. Dacă se constată că nu a urmat o cinetică de ordinul întâi, trebuie utilizate modele mai complexe (apendicele 5).

Dacă nu se obține o stare staționară în 28 de zile, faza de absorbție se va prelungi până la obținerea acesteia sau timp de 60 de zile, preferându-se alternativa cea mai scurtă; apoi începe faza de eliminare.

Constanta de viteză de absorbție, constanta de viteză de epurare (pierdere) (sau constantele, atunci când este vorba de modele complexe), factorul de bioconcentrare și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri, sunt calculate pornind de la modelul care descrie cel mai fidel măsurătorile de concentrație a substanței testate, în pești și în apă.

Factorul BCF se exprimă în funcție de greutatea totală umedă de pește. Totuși, pentru anumite studii, pot fi utilizate țesuturi sau organe specifice (de exemplu, mușchi, ficat), dacă peștii sunt suficient de mari sau dacă pot fi separați în părți comestibile (fileuri) și necomestibile (viscere). Existând o relație clară care leagă potențialul de bioconcentrare și lipofilia pentru numeroase substanțe organice, va exista și o relație corespunzătoare între conținutul lipidic la peștii pentru experiență și bioconcentrațiile observate pentru aceste substanțe. Așadar, pentru a elimina această variabilă din rezultatele experiențelor cu substanțe foarte lipofile (adică având  $\log P_{ow} > 3$ ), bioconcentrarea trebuie exprimată în funcție de masa corporală totală și de conținutul lipidic.

Dacă este posibil, conținutul lipidic se va stabili folosind același material biologic care a servit la determinarea concentrației substanței testate.

#### 1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

Înainte de a executa experiența de bioconcentrare, următoarele informații trebuie cunoscute despre substanța testată:

- solubilitatea în apă;
- coeficientul de partiție octanol-apă  $P_{ow}$  (de asemenea,  $K_{ow}$ , determinat printr-o metodă HPLC în A.8);
- hidroliza;
- fototransformarea în apă, la radiația solară sau solară artificială simulată și în condițiile de radiații ale experienței de bioconcentrare (3);

**▼B**

- tensiunea superficială (adică pentru substanțele la care  $\log P_{ow}$  nu a putut fi măsurat);
- presiunea de vapori;
- biodegradabilitatea numită „facilă” (dacă este cazul).

De asemenea, trebuie cunoscută toxicitatea relativă pentru specia de pești utilizată pentru experiență, de preferință  $CL_{50}$  asimptotică (adică, independentă de timp). Este indispensabil să se utilizeze o metodă analitică potrivită, cu exactitatea, precizia și sensibilitatea, cunoscute, pentru a cuantifica substanța testată în soluția experimentală și în materialul biologic, precum și informații precise legate de prepararea și păstrarea eșantioanelor. De asemenea, trebuie să fie cunoscută limita de detecție analitică a substanței testate, atât în apă cât și în țesuturile peștilor. Dacă se utilizează o substanță pentru testat marcată cu  $^{14}C$ , trebuie cunoscut procentajul de radioactivitate asociat impurităților.

#### 1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie îndeplinite următoarele condiții:

- variația de temperatură să fie mai mică de  $\pm 2$  °C;
- concentrația oxigenului dizolvat să nu coboare sub 60 % din nivelul de saturație;
- concentrația substanței testate în vase să fie menținută la  $\pm 20$  % din media valorilor măsurate în timpul fazei de absorbție;
- mortalitatea și alte efecte sau maladii indezirabile, înregistrate la peștii martor sau la cei supuși experimentului, să fie mai mici de 10 %, la sfârșitul experimentului; atunci când experimentul se prelungește pe mai multe săptămâni sau luni, mortalitatea sau alte efecte indezirabile, apărute la cele două grupe de pești, trebuie să fie mai mici de 5 % pe lună și să nu depășească 30 % în total.

#### 1.6. COMPUȘI DE REFERINȚĂ

Utilizarea compușilor de referință, având un potențial de bioconcentrare cunoscut, ar putea sprijini controlul asupra procedurii experimentale, dacă este necesar. Totuși, nu se pot încă recomanda substanțe specifice.

#### 1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

##### 1.7.1. Aparatură

Se vor evita materialele care pot prezenta un efect indezirabil de absorbție, de dizolvare sau de lesivaj asupra peștilor, și aceasta pentru toate echipamentele folosite. Se vor utiliza bazine standard rectangulare sau cilindrice, din materiale inerte chimic, de capacitate adaptată regimului de umplere. Se va reduce la minimum folosirea de țevi din plastic flexibil. Este preferabilă tubulatura din teflon (®), oțel inoxidabil și/sau sticlă. Experiențele au dovedit că, pentru substanțele cu coeficienți mari de absorbție, cum ar fi piretrinele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În acest caz, echipamentul se va arunca după utilizare.

▼ **B**1.7.2. *Apa*

În general, se utilizează apă naturală, provenită dintr-o sursă nepoluată și de calitate uniformă. Calitatea apei utilizate pentru diluție trebuie să permită supraviețuirea speciei de pești aleasă, în perioada de aclimatare și în cursul experimentului, fără apariția vreunui comportament anormal. În cazul ideal, ar trebui demonstrat că speciile supuse experimentului, pot supraviețui, crește și reproduce în apa de diluție (de exemplu, prin creștere în laborator sau printr-un studiu de toxicitate asupra unui ciclu biologic). Apa va fi caracterizată cel puțin prin pH, duritate, materii solide totale, carbon organic total și, de preferință, prin conținutul de substanțe amoniacale, nitrați și alcalinitate; pentru speciile marine, apa va fi caracterizată și prin salinitate. Se cunosc perfect principalii parametri optimi pentru pești, iar apendicele 1 indică concentrațiile maxime recomandate unui anumit număr de parametri, privind apa folosită la experiment, dulce și marină.

Pe toată perioada testării, apa trebuie să fie de calitate constantă. pH-ul se aduce la valori cuprinse între 6,0 și 8,5, însă pentru un experiment dat, pH-ul trebuie să rămână în interiorul unei plaje de  $\pm 0,5$  unități de pH. Pentru a avea siguranța că apa de diluție nu influențează rezultatele studiului (de exemplu, prin complexarea substanței testate) sau că nu afectează negativ performanțele stocului de pești, se vor preleva în mod regulat, eșantioane pentru analiză. De exemplu, este convenabil de făcut aceasta o dată la trei luni, interval în care o apă de diluție își păstrează calitățile, relativ constante; se determină metalele grele (de exemplu: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), anionii și cationii principali (de exemplu: Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ), pesticidele (de exemplu: cele organofosforice totale și cele organoclorurate totale), carbonul organic total și solidele aflate în suspensie. Dacă se demonstrează constanța calităților apei, pe parcursul a cel puțin un an, aceste analize se pot rări, iar intervalele dintre ele pot fi distanțate (de exemplu, la șase luni).

Conținutul în particule naturale, precum și în carbon organic total (TOC) din apa de diluție, vor fi cât mai mici posibil, pentru a evita absorbția substanței testate în materiile organice, ceea ce i-ar putea reduce biodisponibilitatea (4). Valoarea maximă admisă este de 5 mg/l, pentru particulele de materie (materia uscată nu trece printr-un filtru de 0,45  $\mu\text{m}$ ) și de 2 mg/l, pentru carbonul organic total (a se vedea apendicele 1). Dacă este necesar, apa se va filtra înainte de utilizare. De asemenea, contribuțiile peștilor testați (excreții), a reziduurilor alimentare, ca și conținutul apei în carbon organic total – trebuie să fie cât mai mici posibil. De-a lungul întregului experiment, concentrația în carbon organic din recipient, nu trebuie să depășească cu mai mult de 10 mg/l ( $\pm 20\%$ ), concentrația de carbon organic provenit din substanța testată și, eventual, pe cea a agentului de dizolvare.

1.7.3. *Soluții de testat*

Se prepară o soluție stoc de substanță de testat, la concentrația dorită. De preferință, soluția stoc va fi preparată prin simpla amestecare ori agitare a substanței testate, în apa de diluție. Nu este recomandată utilizarea solvenților sau a dispersanților (agenți de dizolvare); se poate totuși recurge la aceștia, în anumite situații, pentru producerea soluției stoc, la concentrația necesară. Solvenții susceptibili a fi utilizați sunt: etanol, metanol, eterul monometilic de etilen glicol, eterul dimetilic de etilen glicol, dimetilformamida și trietilen glicolul. Dispersanții utilizabili sunt: Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Se vor lua măsuri de precauție în cazul utilizării agenților ușor biodegradabili, aceștia putând provoca probleme de creștere bacteriană în testele cu reînnoire continuă. Substanța testată poate fi marcată radioactiv și trebuie să aibă cea mai mare puritate posibilă (de exemplu, de preferință,  $> 98\%$ ).

**▼B**

Pentru experimentele cu reînnoire continuă, se va utiliza aparatură care să aducă și să dilueze în permanență, soluția stoc de substanță testată (cum ar fi: pompe dozatoare, diluator proporțional, sistem saturator), pentru a aduce concentrațiilor experimentale până la recipiente. Trebuie prevăzute minimum cinci volume de înlocuitor pe zi, pentru fiecare incintă experimentală. Se optează pentru metoda cu reînnoire continuă, însă dacă aplicarea acesteia devine imposibilă (de exemplu, organismele din cadrul experimentului suferă efecte nefaste), se poate recurge la o tehnică semistatică, în cazul în care criteriile de validare rămân satisfăcătoare. Debitul soluțiilor stoc și al apei de diluție va fi controlat cu 48 de ore înainte de experiment, iar în cursul derulării acestuia, cel puțin zilnic. Controlul comportă determinarea debitului în fiecare incintă experimentală, având grijă ca acesta să nu difere cu mai mult de 20 %, pentru fiecare dintre ele.

#### 1.7.4. *Alegerea speciilor*

Printre criteriile importante de alegere a speciilor, figurează cel al facilității de procurare, dimensiunea și posibilitatea întreținerii ușoare în laborator. De asemenea, speciile de pești se aleg în funcție de importanța lor în materie de distracții, comerț sau ecologie. Speciile de pești trebuie să fie de sensibilitate comparabilă, care au produs rezultate bune anterior etc.

În apendicele 2 se află o listă de specii recomandate pentru experiențe. Pot fi utilizate și alte specii, însă atunci procedura experimentală ar putea avea nevoie de adaptări, pentru a se determina condiții de testare adecvate. Într-un asemenea caz, se expun motivațiile alegerii speciilor și a metodei de testare folosite.

#### 1.7.5. *Păstrarea peștilor*

Populația de pești trebuie aclimatizată timp de cel puțin două săptămâni, în apă aflată la temperatura experimentală, oferindu-li-se hrană suficientă și de același tip cu cea folosită în cursul experimentului.

După o perioadă de instalare de 48 de ore, se înregistrează rata mortalității, aplicându-se următoarele criterii:

- mortalitate mai mare de 10 % din populație, în șapte zile: se renunță la întregul lot;
- mortalitate cuprinsă între 5 și 10 % din populație, în șapte zile: se prelungește perioada de aclimatare cu șapte zile;
- mortalitate mai mică de 5 % din populație, în șapte zile: se acceptă lotul – dacă mortalitatea depășește 5 % în următoarele șapte zile, se renunță la întregul lot.

Peștii utilizați pentru experimente nu trebuie să prezinte maladii și nici anomalii observabile. Se elimină toți peștii bolnavi. Peștii nu vor fi tratați contra niciunei maladii, două săptămâni înaintea experimentului și nici în cursul acestuia.

**▼B****1.8. DESFĂȘURAREA TESTULUI****1.8.1. *Testul preliminar***

Se poate dovedi utilă o experimentare preliminară, pentru optimizarea condițiilor de execuție ale experimentului real, în ceea ce privește, de exemplu, selecția concentrațiilor substanței testate, duratele fazelor de absorbție și de eliminare.

**1.8.2. *Condiții de expunere*****1.8.2.1. Durata fazei de absorbție**

Se poate estima durata fazei de absorbție, cu ajutorul unei experiențe preliminare (de exemplu, plecând de la un studiu anterior sau de la un produs chimic cu proprietăți de acumulare) sau pornind de la anumite relații empirice, bazate pe ceea ce se cunoaște despre solubilitatea în apă ori folosind coeficientul de partiție octanol/apă, al substanței testate (a se vedea apendicele 3).

Faza de absorbție va dura 28 de zile, exceptând cazul în care se poate demonstra că a fost atins un echilibru mai devreme. Dacă nu se ajunge la o stare staționară în decurs de 28 de zile, faza de echilibru se va prelungi și se vor face alte măsurători, până la obținerea stării staționare sau timp de 60 de zile (are întâietate alternativă cea mai scurtă).

**1.8.2.2. Durata fazei de eliminare**

În general, jumătate din durata fazei de absorbție este suficient pentru a se produce o reducere convenabilă (de exemplu, 95 %) a conținutului corporal în substanță testată (a se vedea explicațiile privind estimarea, în apendicele 3). Dacă timpul necesar pentru realizarea unei pierderi de 95 % este prea lung, depășind, de exemplu, de două ori durata fazei de absorbție (adică mai mare de 56 de zile), se poate opta pentru o perioadă mai scurtă (respectiv, până ce concentrația substanței testate devine mai mică cu 10 % din concentrația stării staționare). Totuși, pentru substanțele având scheme de absorbție și eliminare mai complexe decât modelul peștilor în compartiment unic, după o cinetică de ordinul întâi, se utilizează faze de epurare mai lungi, pentru determinarea constantelor de viteză de eliminare. Această perioadă de timp poate fi totuși controlată prin intermediul perioadei în care concentrația substanței testate din pești se situează deasupra limitei de detecție analitice.

**1.8.2.3. Numărul de pești pentru experiment**

Alegerea numărului de pești pentru concentrația experimentală, se face astfel încât să fie disponibili cel puțin patru pești per eșantion, la fiecare eșantionare. Dacă se dorește o statistică mai performantă, numărul peștilor per eșantion va fi mărit.

Dacă se folosesc pești adulți, se va indica dacă sunt masculi sau femele ori dacă ambele sexe servesc experimentului. În această ultimă situație, înainte de a începe expunerea, trebuie verificat ca diferențele de conținut lipidic să nu fie semnificative; s-ar putea dovedi necesară utilizarea de loturi distincte de masculi și femele.

**▼B**

Toate experiențele se fac utilizând pești de greutate asemănătoare, în sensul că cei mai mici nu vor avea o greutate mai mică decât 2/3 din cea a peștilor celor mai mari. Toți vor aparține aceleiași clase de vârstă și vor proveni din aceeași sursă. Greutatea și vârsta unui pește, având aparent efecte notabile asupra valorilor BCF (1), aceste informații vor fi înregistrate cu precizie. Este indicat ca un sub-eșantion din populația de pești să fie cântărit înainte de experiment, pentru estimarea greutății medii.

#### 1.8.2.4. Încărcarea

Raporturile apă/pești se măresc, în scopul de a minimiza scăderea  $C_w$  datorită adăugării peștilor, la începutul experimentului, dar și pentru a evita diminuarea concentrației în oxigen dizolvat. Este important ca regimul de încărcare să fie adaptat speciei utilizate pentru experiment. Un regim de încărcare de 0,1-1,0 g de pește (produs viu) la litru de apă și pe zi, este cel recomandat pentru toate cazurile experimentale. Se pot realiza încărcări mai rapide, dacă se demonstrează că se poate ajusta concentrația necesară de substanță testată, în limitele de  $\pm 20\%$  și că, de asemenea, concentrația oxigenului dizolvat, nu coboară sub 60 % din nivelul de saturare.

La alegerea regimului de încărcare, se va ține cont de habitatul normal al speciei. De exemplu, peștii bentonici pot necesita un acvariu cu suprafața fundului mai mare, spre deosebire de speciile pelagice, la același volum de apă.

#### 1.8.2.5. Alimentația

Pe parcursul perioadelor de alimentare și experimentale, peștii vor fi hrăniți după un regim adecvat, cu un conținut cunoscut în lipide și proteine totale, în cantitate suficientă menținerii peștilor în stare bună de sănătate, astfel încât greutatea lor corporală să se conserve. Peștii vor fi alimentați zilnic, în perioadele de aclimatare și în cele experimentale, cu rații de aproximativ 1-2 % din greutatea lor corporală. Astfel, pentru cea mai mare parte dintre specii, se menține concentrația lipidică la un nivel relativ constant, de-a lungul experimentului. Cantitatea de hrană trebuie recalculată o dată pe săptămână, de exemplu, pentru menținerea greutății corporale și a conținutului lipidic la un nivel consistent. Pentru acest calcul, greutatea peștilor din fiecare incintă experimentală se va estima pornind de la greutatea peștilor eșantionați cel mai recent, din respectiva incintă. Nu se cântăresc peștii rămași în incintă.

Hrana neconsumată și excrementele vor fi evacuate zilnic, prin sifonarea incintelor experimentale, la puțin timp după alimentare (30 minute-1 oră). Incintele vor fi menținute cât mai curate posibil, în cursul întregului experiment, astfel încât concentrația de materie organică să fie cât mai mică, deoarece prezența carbonului organic poate limita biodisponibilitatea substanței testate (1).

Numeroase alimente fiind derivate din făină de pește, acestea vor fi analizate pentru determinarea conținutului în substanță testată. De asemenea, trebuie analizat conținutul hranei în pesticide și metale grele.



**▼B****1.8.2.6. Iluminare și temperatură**

În general, fotoperioda este de 12-16 ore, la temperatura ( $\pm 2$  °C) corespunzătoare speciei utilizate (a se vedea apendicele 2). Tipul și caracteristicile iluminării vor fi clar definite. Se va ține seama de eventualele fototransformări ale substanței testate, în condițiile de iradiere ale studiului. Iluminarea nu trebuie să expună peștii la fotoproduse nenaturale. În anumite cazuri, poate fi esențială utilizarea de filtre, pentru blocarea radiației UV mai mică de 290 nm.

**1.8.2.7. Concentrații experimentale**

Peștii sunt expuși la o reînnoire continuă de cel puțin două concentrații apoase ale substanței testate. În mod normal, concentrația mare (sau cea mai mare) a substanței testate, este stabilită la aproximativ 1 % din CL<sub>50</sub> acută asimptotică și de cel puțin 10 ori mai mare decât limita sa de detecție în apă, prin metoda de analiză aleasă.

Cea mai mare concentrație testată poate fi stabilită și împărțind CL<sub>50</sub> la 96 ore, printr-un raport procentual adecvat acut/cronic (rapoartele procentuale adecvate ale anumitor produși chimici pot varia de la 3 la 100). Dacă este posibil, se alege altă concentrație (alte concentrații), astfel încât diferența față de cea căreia îi este superioară, să atingă un factor zece. Dacă este imposibil, din cauza criteriului de 1 % al CL<sub>50</sub> și a limitei analitice, poate fi utilizat un factor inferior celui de zece sau se poate accepta intervenția unei substanțe marcate radioactiv cu <sup>14</sup>C. Niciuna dintre concentrațiile utilizate nu va depăși solubilitatea substanței testate.

Atunci când se utilizează un agent de dizolvare, concentrația acestuia nu va depăși 0,1 ml/l și trebuie să fie aceeași, în toate recipientele pentru experiment. Contribuția sa, adăugată celei a substanței testate, la conținutul global de carbon organic din apa pentru experiment, trebuie să fie cunoscute. Totuși, se va face tot posibilul să nu se recurgă la astfel de materiale.

**1.8.2.8. Martori**

Apă de diluție martor sau, dacă este necesar, un martor conținând agentul de dizolvare va fi disponibil pentru seria de teste, în măsura în care a fost stabilit că agentul nu are niciun efect asupra peștilor. În caz contrar, se vor folosi doi martori.

**1.8.3. Frecvența de măsurare a calității apei**

În cursul experimentului, oxigenul dizolvat, COT, pH-ul și temperatura vor fi măsurate în toate recipientele. Durețea totală și eventual, salinitatea, vor fi măsurate pe martori și la un recipient cu conținutul având concentrația mare (cea mai mare). Oxigenul dizolvat și eventual, salinitatea vor fi măsurate de cel puțin trei ori – la începutul, mijlocul și sfârșitul perioadei de absorbție – și cel puțin o dată pe săptămână, în perioada de eliminare. TOC se va măsura la începutul experimentului (24 și 48 ore înainte de demararea fazei de absorbție), înainte de adăugarea peștilor și cel puțin o dată pe săptămână, în perioadele de absorbție și de eliminare. Temperatura se va măsura zilnic, pH-ul – la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade – iar durețea, o dată pentru fiecare experiment. De preferință, temperatura va fi supravegheată continuu, cel puțin într-unul dintre recipiente.

**▼B**1.8.4. *Eșantionarea și analiza peștilor și a apei*

## 1.8.4.1. Programarea eșantionării peștilor și a apei

Se va preleva apă din incintele experimentale, pentru determinarea concentrației substanței testate, înainte de adăugarea peștilor și în cursul fazelor de absorbție și de epurare. Ca un minim, apa va fi prelevată în același timp cu prelevarea peștilor și înainte de hrănirea lor. În timpul fazei de absorbție, concentrațiile de substanță testată se determină pentru a verifica dacă ele satisfac criteriile de validitate.

În cursul fazei de absorbție, peștii sunt eșantionați de cel puțin cinci ori, iar în timpul fazei de epurare, de cel puțin patru ori. Uneori este dificil de calculat o valoare estimativă rezonabil de precisă pentru BCF, pe baza acestui număr de eșantioane, în special atunci când nu urmează o cinetică simplă de epurare, de ordinul întâi. În acest caz, se pot realiza eșantionările mai frecvent, pentru cele două perioade (a se vedea apendicele 4). Eșantioanele suplimentare sunt stocate și analizate numai dacă rezultatele primei serii de analize se dovedesc insuficiente pentru calculul BCF cu precizia dorită.

În apendicele 4 se găsește un exemplu de calendar acceptabil de eșantionare. Altele pot fi determinate cu ușurință, pe baza valorilor presupuse ale  $P_{ow}$ , pentru a calcula timpul de expunere, corespunzător unei absorbții de 95 %.

Se continuă eșantionarea în cursul fazei de absorbție, până la obținerea unei stări staționare sau timp de 28 de zile, optându-se pentru varianta cea mai scurtă. Dacă nu se obține o stare staționară după 28 de zile, eșantionare continuă până la obținerea unei astfel de stări sau timp de 60 de zile, optându-se pentru alternativa cea mai scurtă. Înainte de începerea fazei de eliminare, peștii se transferă în rezervoare curate.

## 1.8.4.2. Eșantionajul și prepararea eșantioanelor

Se prelevează eșantioane de apă pentru analize, de exemplu prin sifonare cu ajutorul unui tub inert, într-un punct central al incintei experimentale. Întrucât se pare că fracțiile non biodisponibile de substanță testată, nu pot fi separate de cele biodisponibile – nici prin filtrare și nici prin centrifugare – (în particular, în cazul produselor chimice super-lipofile, adică cele care au  $\log P_{ow} > 5$ ) (1) (5), se poate renunța la supunerea eșantioanelor la astfel de tratamente.

În schimb, trebuie avut grijă ca rezervoarele să fie cât mai curate posibil, iar conținutul în carbon organic va fi supravegheat pe întreaga durată a fazelor de absorbție și de eliminare.

Un număr convenabil de pești (în mod normal, cel puțin patru), se prelevează din fiecare incintă experimentală, pentru fiecare eșantionare. Peștii prelevați vor fi clătiți rapid cu apă, uscați cu ajutorul hârtiei absorbante și sacrificați în mod instantaneu, într-o manieră cât mai umană posibil, după care se cântăresc.

Este preferabil să se analizeze peștii și apa, imediat după eșantionare, pentru a se evita orice degradare sau alte pierderi și pentru a calcula în mod aproximativ regimurile de absorbție și de purificare, în vreme ce experimentul continuă să se desfășoare. De asemenea, analiza imediată evită întârzierea constatării atingerii unui platou.

**▼B**

În lipsa unei analize imediate, eșantioanele se vor conserva după o metodă convenabilă. Înainte de începerea studiului, se vor aduna toate datele cu privire la metodele de stocare adecvate substanței testate; de exemplu: congelare, menținere la 4 °C, durata stocării, extracția etc.

#### 1.8.4.3. Calitatea metodei analitice

Integralitatea procedurii fiind determinată, în principal, de exactitatea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța testată, trebuie controlat în mod experimental, ca precizia și reproductivitatea analizei chimice, precum și recuperarea substanței testate – atât din apă cât și din pești – să fie pe deplin satisfăcătoare, în cazul particular al respectivei metode. De asemenea, se are în vedere ca substanța testată să nu fie detectabilă în apa de diluție folosită.

Dacă este necesar, valorile pentru  $C_w$  și  $C_f$ , derivate din experiment, vor fi corectate după compararea cu valorile furnizate de martori și cu concentrația naturală a substanței testate. Pe tot parcursul testării, eșantioanele de pești și de apă sunt astfel manipulate încât să se minimizeze contaminările și pierderile (rezultate, de exemplu, de absorbția prin materialul de eșantionare).

#### 1.8.4.4. Analiza eșantioanelor de pești

Dacă se utilizează materiale marcate radioactiv, se poate analiza marcajul radioactiv total (respectiv, compușii de origine și metabolii) sau purifica eșantioanele, astfel încât compusul de origine să poată fi analizat separat. În plus, principalii metaboliți pot fi caracterizați fie la starea staționară, fie la sfârșitul fazei de absorbție, optându-se pentru varianta cea mai scurtă. Dacă BCF, în funcție de reziduurile marcate radioactiv totale, este  $\geq 1\,000\%$ , ar fi indicat (și, pentru anumite categorii de produse chimice, cum ar fi pesticidele, chiar recomandat cu tărie), să se identifice și cuantifice produsele de degradare reprezentând  $\geq 10\%$  reziduuri totale în țesuturile peștilor, în starea staționară. Dacă aceste produse reprezintă  $\geq 10\%$  reziduuri totale marcate radioactiv, în țesuturile peștilor, ele vor fi identificate și cuantificate; apoi, este recomandat ca acestea să fie identificate și cuantificate, de asemenea, în apa pentru experiment.

În general, concentrația substanței testate trebuie să fie determinată pentru fiecare pește cântărit. Dacă nu este posibil, se pot pune în comun eșantioanele la fiecare testare, însă această metodă restrânge veridicitatea procedurilor statistice a rezultatelor. Dacă o anumită procedură și o finețe statistică specifică sunt urmărite, va fi convenabil să se folosească în experiment, un număr adecvat de pești, pentru satisfacerea procedurii de regrupare și precizia statistică dorită (6) (7).

BCF-ul va fi exprimat atât în funcție de greutatea totală de produs viu, cât și pentru substanțele puternic lipofile, în funcție de conținutul lipidic. Conținutul lipidic al peștilor se determină, dacă este posibil, la fiecare eșantionare. Pentru stabilirea conținutului lipidic, se vor utiliza metode bine adaptate (referințele 8 și 2 ale anexei 3). Se recomandă tehnici de extracție prin cloroform/metanol, ca metode standard (9). Metodele nu oferă rezultate identice (10), motiv pentru care este important să se precizeze care metodă s-a utilizat. Analiza lipidelor se va face, pe cât posibil, pe aceleași extracte consacrate și pentru analiza substanței testate, întrucât, adesea, lipidele trebuie scoase din extras înainte de a-l putea analiza prin cromatografie. Conținutul lipidic al peștilor (în mg/kg de produs proaspăt), la sfârșitul experienței, nu trebuie să difere față de cel inițial, cu mai mult de  $\pm 25\%$ . De asemenea, se va indica procentajul de solide din țesuturi, pentru a permite conversia concentrației lipidice a bazei umede, la cea a bazei uscate.

**▼B****2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Curba de absorbție a substanței testate va rezulta din traseul concentrației sale în funcție de timp, la/în pești (sau în țesuturile specifice), în perioada fazei de absorbție, folosind o scară aritmetică. Dacă curba atinge un platou, adică adoptă aproximativ un traseu asimptotic la axa timpului, starea staționară  $BCF_{ss}$  se va calcula, după cum urmează:

$$\frac{C_f \text{ stare staționară (valori medii)}}{C_w \text{ stare staționară (valori medii)}}$$

Atunci când nu se obține nicio stare staționară, rămâne posibilitatea calculării unui  $BCF_{ss}$  de o precizie suficientă pentru evaluarea riscurilor, pornind de la o „stare staționară” la 80 % ( $1,6/k_2$ ) sau 95 % ( $3,0/k_2$ ) de echilibru.

În plus, factorul de concentrare ( $BCF_k$ ) va fi definit ca raport  $k_1/k_2$  de două constante cinetice de ordinul întâi. Constanta de viteză de eliminare ( $k_2$ ) se determină, în general, plecând de la curba de eliminare (adică de la un traseu al descreșterii concentrației substanței testate din pești, în funcție de timp). Apoi, constanta de viteză de absorbție ( $k_1$ ) va fi calculată în funcție de  $k_2$  și de o valoare a  $C_f$  derivată din curba de absorbție (a se vedea și apendicele 5). Metoda cea mai bună pentru obținerea  $BCF_k$  și a constantelor de viteză  $k_1$  și  $k_2$  este aceea care recurge la metode informatice neliniare de estimare a parametrilor (11). Alternativ, se pot utiliza metode grafice pentru calculul  $k_1$  și  $k_2$ . Dacă curba de purificare se dovedește a nu fi de ordinul întâi, trebuie utilizate modele mai complexe (a se vedea referințele din apendicele 3) și să se ceară opinia unui biostatistician.

**2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Rezultatele se vor interpreta cu precauție, atunci când concentrațiile măsurate de soluție experimentală se află la valori apropiate de limita de detecție a metodei de analiză.

Claritatea cu care sunt definite curbele de absorbție și de eliminare, dovedește buna calitate a datelor de bioconcentrare. Variația constantelor de absorbție/eliminare, între cele două concentrații experimentale, trebuie să fie mai mică de 20 %. Diferențele considerabile observate la ratele de absorbție/eliminare, între cele două experimente de concentrare, vor fi înregistrate și explicate, dacă este posibil. În general, limita de încredere pentru BCF se apropie de  $\pm 20\%$ , în studiile bine concepute.

**3. RAPORT**

Procesul verbal al testării va cuprinde informațiile următoare:

**3.1. SUBSTANȚA TESTATĂ:**

- natura fizică și, eventual, proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare chimică (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar);
- în cazul marcării radioactive, poziția precisă a atomului (atomilor) marcat (marcați) și procentajul de radioactivitate asociată impurităților.

**▼B****3.2. SPECIILE UTILIZATE:**

- denumire științifică, sușă, sursă, orice tratament prealabil eventual, aclimatare, vârstă, gama de dimensiuni etc.

**3.3. CONDIȚII DE TESTARE:**

- procedura utilizată (de exemplu, reînnoirea continuă sau semis-tatică);
- tipul și caracteristicile iluminării utilizate și fotoperioada (fotoperioadele);
- conceptul experimental (de exemplu, numărul și dimensiunea incintelor experimentale, regimul de înlocuire al volumelor de apă, numărul de subeșantioane și de pești per subeșantion, număr de concentrații testate, durata fazelor de absorbție și de epurare, frecvența eșantionării pentru pești și pentru apă);
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența de reînnoire (agentul de dizolvare, concentrația sa și contribuția sa la conținutul în carbon organic al apei pentru experiență – vor fi menționate, dacă este cazul);
- concentrațiile experimentale nominale, mediile valorilor măsurate și deviația standard a acestora în recipientele experimentale, precum și metoda de obținere;
- sursa de apă de diluție, descrierea tuturor tratamentelor prealabile, rezultatele tuturor demonstrațiilor de aptitudine a peștilor de supraviețuire în această apă și caracteristicile apei: pH, duritate, temperatură, concentrația în oxigen dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă este măsurat), carbonul organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului experimental (dacă este cazul) și orice alte măsurători făcute;
- calitatea apei în recipientele experimentale, pH, duritate, temperatura și concentrația în oxigen dizolvat;
- informații precise legate de alimentație (de exemplu, tipul de hrană, sursă, compoziție – cel puțin conținutul în lipide și proteine dacă este posibil, cantitatea dată și frecvența);
- informații legate de tratamentul peștilor și al apei eșantionate, inclusiv detalii de preparare, stocare, extracție, proceduri (și precizia) de analiză a substanței testate și conținutul în lipide (dacă s-a măsurat).

**3.4. REZULTATE:**

- rezultatele studiilor preliminare efectuate;
- mortalitatea peștilor martor și a peștilor din fiecare incintă experimentală, precum și orice comportament anormal observat;
- conținutul lipidic al peștilor (dacă a fost determinat cu ocazia experimentului);
- curbele (din toate măsurătorile efectuate) exprimând absorbția și eliminarea produselor chimice experimentale la pești, timpul de acces la starea staționară;

**▼B**

- $C_f$  și  $C_w$  (cu deviația standard și, eventual, intervalul) la momentul fiecărei eșantionări [ $C_f$  se exprimă în  $\mu\text{g/g}$  de produs viu (ppm), din întreg peștele sau din anumite țesuturi; de exemplu, lipidele și  $C_w$  se exprimă în  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)]. Valorile  $C_w$  pentru seria martor (de asemenea, se indică concentrația de bază);
- factorul de bioconcentrare în starea staționară ( $\text{BCF}_{ss}$ ) și/sau factorul de concentrare cinetică ( $\text{BCF}_k$ ) și, dacă este cazul, limitele de încredere la 95 % ale constantelor de viteză de absorbție și de eliminare (pierdere), toate exprimate în raport cu întregul corp și cu conținutul total de lipide, dacă acesta este măsurat, ale peștelui (ori ale anumitor țesuturi), limitele de încredere și deviația standard (dacă este disponibilă), metode de calcul/analiză ale rezultatelor, pentru fiecare concentrație a substanței test utilizate;
- atunci când se folosesc substanțe marcate radioactiv, poate fi semnalată acumularea tuturor metaboliților, dacă este necesar;
- toate situațiile neobișnuite legate de experiment, toate devierile de la aceste proceduri și orice alte informații pertinente.

Se minimizează rezultatele de tipul „nedetectabil la limita de detecție”, prin folosirea unei metode experimentale preliminare și elaborarea unui concept experimental, deoarece astfel de rezultate sunt inutile pentru calculul constantelor de viteză.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Connell D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, p. 117-156.
2. Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.
3. OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No 3.
4. Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
5. US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
6. US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975
7. US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
8. Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation” Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, Haga, Olanda.

**▼B**

9. Gardner *et al.*, (1995) *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099-1105.
10. Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, p. 1431-1436.
11. CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method – Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
12. ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.



*Apendicele 1*

**Caracteristici chimice acceptabile ale apei de diluție**

|    | Substanța   | Concentrația-limită |
|----|---|---------------------|
| 1  | Particule insolubile                                  | 5 mg/l              |
| 2  | Carbon organic total                                  | 2 mg/l              |
| 3  | Amoniac neionizat                                     | 1 µg/l              |
| 4  | Clor rezidual   | 10 µg/l             |
| 5  | Pesticide organofosforice totale                      | 50 ng/l             |
| 6  | Pesticide organofluorurate totale + policlorobifenili | 50 ng/l             |
| 7  | Clor organic total                                    | 25 ng/l             |
| 8  | Aluminiu  | 1 µg/l              |
| 9  | Arsen   | 1 µg/l              |
| 10 | Crom  | 1 µg/l              |
| 11 | Cobalt  | 1 µg/l              |
| 12 | Cupru   | 1 µg/l              |
| 13 | Fier  | 1 µg/l              |
| 14 | Plumb   | 1 µg/l              |
| 15 | Nichel  | 1 µg/l              |
| 16 | Zinc  | 1 µg/l              |
| 17 | Cadmiu  | 100 ng/l            |
| 18 | Mercur  | 100 ng/l            |
| 19 | Argint  | 100 ng/l            |





## Apendicele 2

## Specii de pești recomandate pentru experimente

|   | Specii recomandate  | Intervalul de temperatură recomandat pentru testare (°C) | Lungimea totală recomandată a animalului de experiență (cm) |
|---|---|--|---|
| 1 | Danio rerio <sup>(1)</sup> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Hamilton-Buchanan) Zebra | 20-25  | 3,0 ± 0,5   |
| 2 | Pimephales promelas ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Rafinesque)                     | 20-25  | 5,0 ± 2,0   |
| 3 | Cyprinus carpio ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Linnaeus) Crap                      | 20-25  | 5,0 ± 3,0   |
| 4 | Oryzias latipes ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Temminck and Schlegel) Medaka      | 20-25  | 4,0 ± 1,0   |
| 5 | Poecilia reticulata ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Peters) Guppy                  | 20-25  | 3,0 ± 1,0   |
| 6 | Lepomis macrochirus ( <i>Teleostei, Centrarchidae</i> ) (Rafinesque) Biban-soare      | 20-25  | 5,0 ± 2,0   |
| 7 | Oncorhynchus mykiss ( <i>Teleostei, Salmonidae</i> ) (Walbaum) Păstrăv curcubeu       | 13-17  | 8,0 ± 4,0   |
| 8 | Gasterosteus aculeatus ( <i>Teleostei, Gasterosteidae</i> ) (Linnaeus) Ghidrin țepos  | 18-20  | 3,0 ± 1,0   |

<sup>(1)</sup> Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

În anumite țări, au fost utilizate diverse specii marine și de estuar, de exemplu:

*Leiostomus xanthurus*

*Cyprinodon variegatus*

*Menidia beryllina*

*Cymatogaster aggregata*

*Parophrys vetulus*

*Leptocottus armatus*

*Gasterosteus aculeatus*

Ghidrin țepos

*Dicentrarchus labrax*

Biban comun

*Alburnus alburnus*

Obleț

## Recoltare

Peștii de apă dulce, menționați în tabelul de mai sus, sunt ușor de crescut și/sau foarte disponibili, tot timpul anului, față de speciile marine sau de estuar, a căror disponibilitate este, în anumite țări, limitată. Ei se reproduc și trăiesc atât în fermele piscicole cât și în laboratoare, în condițiile în care maladiile și paraziții se află sub control; așadar, animalele utilizate vor fi în stare bună de sănătate, cu ascendență genetică cunoscută. Pot fi găsiți aproape în întreaga lume.

**▼B***Apendicele 3***Estimarea duratei fazelor de absorbție și de eliminare****1. Proгноza pentru durata fazei de absorbție**

Înainte de executarea testării, se poate estima  $k_2$  și deci, un procentaj de timp necesar pentru a ajunge la starea staționară, pornind de la relațiile empirice între  $k_2$  și coeficientul de separare n-octanol/apă ( $P_{ow}$ ) sau între  $k_2$  și solubilitatea în apă ( $s$ ).

Se estimează  $k_2$  (zile<sup>-1</sup>) pornind, de exemplu, de la relația empirică următoare (1):

$$\log_{10}k_2 = 0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (\text{ecuația 1})$$

Pentru alte relații, a se vedea referința bibliografică 2.

Dacă coeficientul de partiție ( $P_{ow}$ ) nu este cunoscut, se va proceda la o estimare (3), plecând de la solubilitatea în apă ( $s$ ) a substanței, după cum urmează:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (\text{ecuația 2})$$

unde:

$s$  = solubilitatea (mol/l): ( $n = 36$ )

Aceste relații se aplică numai produselor chimice, ale căror valori  $\log P_{ow}$  se situează între 2 și 6,5 (4).

Timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară va rezulta din ecuația cinetică generală, indicându-se absorbția și eliminarea (cinetica de ordinul I), prin aplicarea estimării  $k_2$ :

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

unde, dacă  $C_w$  este constant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{ecuația 3})$$

Atunci când ne apropiem de starea staționară ( $t \rightarrow \infty$ ), ecuația 3 se reduce (5) (6) la:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ sau } C_f/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

Raportul  $k_1/k_2 \cdot C_w$  se apropie astfel de concentrația substanței din pești, în „starea staționară” ( $C_{f,s}$ ).

Așadar, ecuația 3 poate fi transcrisă:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \text{ sau } \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{ecuația 4})$$

Timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară poate fi prevăzut grație ecuației 4, atunci când  $k_2$  a fost în prealabil estimat cu ajutorul ecuațiilor 1 sau 2.

**▼B**

Cu titlu informativ, durata optimă statistică a fazei de absorbție, care permite obținerea de rezultate statistice acceptabile ( $BCF_k$ ), este perioada necesară pentru ca curba logaritmului concentrației de substanță testată din pești, trasată în funcție de timp în scară lineară, să ajungă la punctul median, adică la  $1,6/k_2$  sau la 80 % din starea staționară, fără a depăși  $3,0/k_2$  sau 95 % din starea staționară (7).

Timpul până la atingerea a 80 % din starea staționară este (ecuația 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ sau } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (\text{ecuația 5})$$

Similar, pentru 95 % din starea staționară:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (\text{ecuația 6})$$

De exemplu, durata fazei de absorbție (abs.) a unei substanțe testate, având un  $\log P_{ow} = 4$ , va fi (folosind ecuațiile 1, 5 și 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414(4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ zile}^{-1}$$

$$\text{abs. (80 \%)} = 1,6/0,652 \text{ adică } 2,45 \text{ zile (59 ore)}$$

$$\text{sau abs. (95 \%)} = 3,0/0,652 \text{ adică } 4,60 \text{ zile (110 ore)}$$

În același mod, pentru o substanță testată cu  $s = 10^{-5}$  mol/l [ $\log(s) = -5,0$ ], durata de absorbție va fi (folosind ecuațiile 1, 2, 5 și 6):

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0,862(-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} K_2 = 0,414(5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ zile}^{-1}$$

$$\text{abs. (80 \%)} = 1,6/0,246 \text{ adică } 6,5 \text{ zile (156 ore)}$$

$$\text{sau abs. (95 \%)} = 3,0/0,246 \text{ adică } 12,2 \text{ zile (293 ore)}$$

De asemenea, se poate utiliza expresia alternativă:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^3 P_{ow} + 55,31 \text{ (ore)}$$

pentru calculul timpului de atingere a stării staționare (4).

## 2. Estimarea duratei fazei de eliminare

Se poate estima, de asemenea, timpul necesar pentru ca substanța testată ajunsă în corpul peștilor să se reducă la un anumit procentaj din concentrația inițială, grație ecuației generale, ilustrând absorbția și eliminarea (cinetica de ordinul I) (1) (8).

Pentru faza de eliminare  $C_w$  este considerată nulă. Ecuația poate fi redusă la:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ sau } C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

**▼B**

unde  $C_{f,0}$  este concentrația la începutul perioadei de eliminare. Se va obține apoi o eliminare de 50 %, la momentul ( $t_{50}$ ):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ sau } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

În același mod, 95 % din faza de eliminare va fi atinsă la:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Dacă ne plasăm la 80 % din faza de absorbție pentru prima perioadă ( $1,6/k_2$ ) și la 95 % din pierderi pentru faza de eliminare ( $3,0/k_2$ ), atunci faza de eliminare este aproximativ dublul duratei fazei de absorbție.

Totuși, este important de menționat că aceste estimări se bazează pe ipoteza că schemele de absorbție și eliminare urmează o cinetică de ordinul întâi. Dacă nu este cazul, se vor folosi modele mai complexe (de exemplu, referința bibliografică 1).

**Bibliografie (pentru apendicele 3)**

1. Spacie A. and Hamelink J. L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, p. 309-320.
2. Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
3. Chiou C. T. and Schmedding D. W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1), p. 4-10.
4. Hawker D. W. and Connell D. W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22 (6), p. 701-707.
5. Branson D. R., Blau G.E., Alexander H. C. and Neely W. B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), p. 785-792.
6. Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehmann P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P. H. Part 4.4 p. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
7. Reilly P. M., Bajramovic R., Blau G. E., Branson D.R. and Sauerhoff M. W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* 55, p. 614-622.
8. Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, p. 3-19.

▼ B

## Apendicele 4

Exemple teoretice de grafice de eșantionare pentru testele de bioconcentrare ale substanțelor cu  $\log P_{ow} = 4$ 

| Prelevări de pești | Calendar de eșantionare        |                          | Număr eșantioane de apă | Număr de pești per eșantion                                    |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|--|
|                    | Frecvența minimă cerută (zile) | Eșantionare suplimentară |                         |  |
| Faza de absorbție  | – 1<br>0                       |                          | 2 (*)<br>2              | se adaugă 45-80 de pești                                       |
| I                  | 0,3                            | 0,4                      | 2<br>(2)                | 4<br>(4)   |
| II                 | 0,6                            | 0,9                      | 2<br>(2)                | 4<br>(4)   |
| III                | 1,2                            | 1,7                      | 2<br>(2)                | 4<br>(4)   |
| IV                 | 2,4                            | 3,3                      | 2<br>(2)                | 4<br>(4)   |
| V                  | 4,7                            |                          | 2                       | 6  |
| Faza de epurare    |                                |                          |                         | Peștii se transferă într-o apă care nu conține produsul testat |
| VI                 | 5,0                            | 5,3                      |                         | 4<br>(4)   |
| VII                | 5,9                            | 7,0                      |                         | 4<br>(4)   |
| VIII               | 9,3                            | 11,2                     |                         | 4<br>(4)   |
| IX                 | 14,0                           | 17,5                     |                         | 4<br>(6)   |

(\*) Se prelevează apa după adăugarea a cel puțin 3 volume ale incintei experimentale.

Valorile dintre paranteze sunt numere de eșantioane (apă, pești) care trebuie prelevate, dacă se procedează la o eșantionare suplimentară.

*Notă:* Estimarea înaintea experimentului a lui  $k_2$ , pentru un  $\log P_{ow} = 4,0$  este de  $0,652 \text{ zile}^{-1}$ . Durata totală a experimentului este fixată la:  $3 \times \text{abs.} = 3 \times 4,6$  zile, adică 14 zile. Pentru estimarea „abs.” se utilizează apendicele 3.

▼ **B**

## Apendicele 5

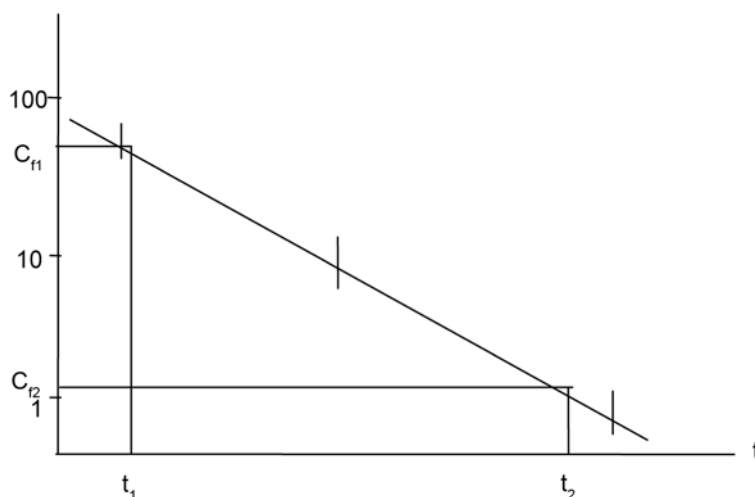
**Deosebirile dintre modele**

S-a presupus că majoritatea rezultatelor de bioconcentrare sunt „rezonabil” de bine descrise, printr-un model simplu cu două compartimente/doi parametri, respectiv printr-o curbă rectilinie ce reprezintă aproximativ punctele de măsură ale concentrațiilor de substanță testată din pești, în cursul fazei de eliminare, pe hârtie semilogaritmică. (Atunci când aceste puncte nu se pot reduce la o dreaptă, este indicat să se recurgă la modele mai complexe, a se vedea, de exemplu, Spacie and Hamelink, referința 1 din bibliografia apendicelui 3.)

**Metoda grafică pentru determinarea constantei de viteză de eliminare (pierdere)  $k_2$** 

Se reprezintă, pe hârtie semilogaritmică, concentrația substanței testate, determinată la fiecare eșantion de pești, conform graficului de eșantionare. Panta acestei drepte este  $k_2$ .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Atenție: abaterile față de această linie dreaptă pot indica o schemă de eliminare mai complexă decât cinetica de ordinul întâi. O metodă grafică poate rezolva acest tip de eliminare care se abate de la cinetica de ordinul întâi.

**Metoda grafică pentru determinarea constantei de viteză de absorbție  $k_1$** 

$k_2$  fiind determinat, se calculează  $k_1$  după cum urmează:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (\text{ecuația 1})$$

Se citește valoarea  $C_f$  în punctul median al curbei de absorbție netezite, aproximată cu o dreaptă, atunci când concentrația logaritmică este trasată în funcție de timp (pe o scară aritmetică).

**▼B****Metoda de calcul informatic a constantelor de viteză de absorbție și de eliminare (pierdere)**

Pentru obținerea factorului de bioconcentrare și a constantelor de viteză  $k_1$  și  $k_2$ , se vor utiliza de preferință metode informatice neliniare de estimare parametrică. Aceste programe determină valorile pentru  $k_1$  și  $k_2$ , utilizând un ansamblu de rezultate secvențiale ale concentrației în timp, în funcție de model:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{ecuația 2})$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad (\text{ecuația 3})$$

unde  $t_c$  = timpul la sfârșitul fazei de absorbție.

Această metodă furnizează estimarea deviațiilor standard a  $k_1$  și  $k_2$ .

Întrucât, în majoritatea cazurilor, se poate estima  $k_2$  pornind de la curba de eliminare, și aceasta cu o precizie destul de mare, și întrucât există o strânsă corelare între cei doi parametri  $k_1$  și  $k_2$ , este de dorit să se calculeze mai întâi  $k_2$ , pornind numai de la datele de eliminare și după aceea să se calculeze  $k_1$ , de la datele de absorbție, cu ajutorul unei regresii neliniare.

**▼B****C.14. TESTUL DE CREȘTERE A PUIETULUI DE PEȘTE****1. METODĂ**

Metoda de testare a influenței toxicității asupra creșterii reproduce Orientarea 215 (2000) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Acest test urmărește să evalueze efectele expunerii prelungite la produse chimice asupra creșterii puietului de pește. Are la bază o metodă, elaborată și intercalibrată (1) (2) în Uniunea Europeană, de evaluare a efectelor produselor chimice asupra puietului de păstrăv-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) în regim dinamic. Pot fi folosite și alte specii, dacă au fost bine studiate. De exemplu, s-a câștigat experiență din testele de creștere cu peștele-zebră (*Danio rerio*) <sup>(1)</sup> (3) (4) și medaka (*Oryzias latipes*) (5) (6) (7).

A se vedea și Introducerea generală partea C.

**1.2. DEFINIȚII**

**Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO):** este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la  $p < 0,05$ ) în comparație cu lotul martor. Toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

**Concentrația fără efecte observabile (CFEO):** este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

**CE<sub>x</sub>:** în această metodă de testare este concentrația substanței testate care provoacă o variație de x % în rata de creștere a peștelui în comparație cu lotul martor.

**Rata de încărcare:** este greutatea peștelui pe unitatea de volum de apă.

**Densitatea populației:** este numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

**Rata de creștere specifică individuală:** exprimă rata de creștere a unui individ, prin raportare la greutatea sa inițială.

**Rata de creștere specifică medie a bazinului:** exprimă rata de creștere medie a populației din bazin la o concentrație dată.

**Rata de creștere pseudospecifică:** exprimă rata de creștere individuală raportată la greutatea inițială medie a populației din bazin.

<sup>(1)</sup> Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, p. 231-236.



**▼B****1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Puietul piscicol aflat în faza de creștere exponențială este pus, după ce este cântărit, în incintele experimentale și expus la o gamă de concentrații subletale din substanța testată, dizolvată în apă, de preferință în regim dinamic sau, dacă nu este posibil, în condiții semistatice adecvate (regim de curgere discontinuă). Durata testului este de 28 de zile. Peștii sunt hrăniți zilnic. Rația alimentară este în funcție de greutatea corporală inițială și poate fi recalculată după 14 zile. La sfârșitul testului, peștii sunt cântăriți din nou. Efectele asupra ratelor de creștere sunt analizate folosind un model de regresie, pentru a estima acea concentrație care ar avea ca efect o variație a ratei de creștere de  $x$  %, adică a  $CE_x$  (de exemplu  $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$  sau  $CE_{30}$ ). O altă variantă este ca datele să fie comparate cu valorile lotului martor, în scopul de a determina concentrația minimă cu efecte observabile (CMEO) și, de aici, concentrația fără efecte observabile (CFEO).

**1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE**

Trebuie să fie disponibile rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea metoda de testare C.1), de preferință efectuat cu speciile alese pentru acest test. Aceasta înseamnă că se cunosc solubilitatea în apă și presiunea de vapori ale substanței testate, precum și că există o metodă analitică fiabilă și disponibilă pentru cuantificarea substanței în soluții, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și specificate în raport.

Informațiile utile cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea în apă și la lumină,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  și rezultatele testului de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

**1.5. VALIDITATEA TESTULUI**

Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- mortalitatea în lotul (loturile) martor nu trebuie să depășească 10 % la sfârșitul testului;
- greutatea medie a peștilor în lotul (loturile) martor trebuie să fi crescut suficient pentru a permite detectarea variației minime a ratei de creștere considerată ca semnificativă. Un test de intercalibrare (2) a arătat că în cazul păstrăvului-curcubeu greutatea medie a peștelui în lotul martor trebuie să fi crescut în 28 de zile cu cel puțin jumătate (adică 50 %) din greutatea inițială; de exemplu, greutatea inițială: 1 g/pește (= 100 %), greutatea finală, după 28 de zile:  $\geq 1,5$  g/pește ( $\geq 150$  %);
- concentrația de oxigen dizolvat trebuie să fi fost pe toată durata testului de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);
- temperatura apei trebuie să nu difere cu mai mult de  $\pm 1$  °C între bazine în niciun moment pe durata testului și să fie menținută într-un interval de 2 °C în intervalele de temperatură specificate pentru speciile de pești (apendicele 1).

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Aparatură**

Echipamentul obișnuit de laborator și în special următoarele:

- pH-metru și aparat de măsurare a oxigenului;

**▼B**

- echipament pentru determinarea durtății și alcalinității apei;
- aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu supraveghere continuă;
- bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și densitatea populației recomandate (a se vedea punctul 1.8.5 și apendicele 1);
- balanță de precizie adecvată (adică până la  $\pm 0,5$  %).

**1.6.2. Apa**

În test poate fi folosită orice apă în care specia testată prezintă o rată de supraviețuire și de creștere pe termen lung corespunzătoare. Trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Apa trebuie să aibă un pH în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui test dat trebuie să se încadreze într-un interval de  $\pm 0,5$  unități de pH. Se recomandă o durtate (în  $\text{CaCO}_3$ ) de peste 140 mg/l. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin complexare cu substanța testată), trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu: Ca, Mg, Na, K, Cl și  $\text{SO}_4$ ), pesticide (de exemplu pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot face la intervale mai mari (de exemplu la fiecare șase luni). Câteva caracteristici chimice ale unei ape de diluare acceptabile sunt enumerate în apendicele 2.

**1.6.3. Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate).

În unele cazuri, folosirea solvenților sau a agenților de dispersie poate fi necesară pentru a realiza soluția de bază de concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilen-glicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili (de exemplu acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra creșterii peștilor și nici efecte adverse vizibile asupra puietului.

**▼B**

La testele în regim dinamic este necesar un sistem care să distribuie și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare se verifică la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un test de intercalibrare (2) a demonstrat că, în cazul păstrăvului-curcubeu, o frecvență a schimbării apei de 6 litri/g de pește/zi este acceptabilă (a se vedea punctul 1.8.2.2).

La testele în regim semistatic (regim dinamic discontinuu), frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminară (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80-120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic.

#### 1.6.4. Alegerea speciilor

Păstrăvul-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) este specia recomandată pentru acest test deoarece de această specie se leagă cea mai mare parte a experienței câștigate în testele de intercalibrare (1) (2). Cu toate acestea, pot fi folosite și alte specii, bine studiate, dar metoda experimentală s-ar putea să necesite adaptări, pentru a asigura condiții de testare adecvate. De exemplu, există experiență disponibilă și cu peștele-zebră (*Danio rerio*) (3) (4) și cu medaka (*Oryzias latipes*) (5) (6) (7). În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

#### 1.6.5. Îngrijirea peștilor

Peștii de laborator trebuie aleși din aceeași populație, de preferință din aceleași icre, care a fost îngrijită pentru cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare cu acelea folosite la test. Peștii trebuie hrăniți cu o rație minimă zilnică reprezentând 2 % din greutatea corporală, de preferință 4 %, pe întreaga durată de îngrijire și testare.

După o perioadă de acomodare de 48 de ore, se înregistrează mortalitatea și se aplică următoarele criterii:

- mortalitate mai ridicată de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;
- mortalitate între 5 % și 10 % din populație: acomodare pentru încă șapte zile; dacă mortalitatea este peste 5 % în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;
- mortalitate mai scăzută de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă lotul.

Peștii nu trebuie să primească tratament pentru boală în cele două săptămâni anterioare testului sau în timpul testului.

**▼B****1.7. STRUCTURAREA TESTULUI**

„Structurarea testului” se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de bazine pentru fiecare nivel al concentrației și la numărul de pești pe bazin. În mod ideal, structurarea testului ia în considerare:

- obiectivul studiului;
- metoda de analiză statistică urmând a fi folosită;
- disponibilitatea și costul resurselor alocate.

Enunțul obiectivului ar trebui, dacă este posibil, să specifice puterea statistică la care se cere să fie detectată mărimea unei diferențe date (de exemplu în rata creșterii) sau, alternativ, precizia cu care se cere estimarea  $CE_x$  (de exemplu cu  $x = 10, 20$  sau  $30$  și de preferință nu mai mic decât  $10$ ). În absența acestor informații, nu se poate indica în mod precis scara de desfășurare a studiului.

Este important să se accepte ideea că structurarea optimă (care folosește cel mai bine resursele) în raport cu o metodă de analiză statistică nu este în mod necesar optimă în raport cu altă metodă. Structurarea recomandată pentru estimarea CMEO/CFEO nu va fi aceeași cu cea recomandată pentru analiza prin regresie.

În cele mai multe cazuri, analiza de regresie este preferabilă analizei de varianță, din motivele discutate de Stephan și Rogers (8). Cu toate acestea, atunci când nu se găsește un model de regresie corespunzător ( $r^2 < 0,9$ ), ar trebui să se recurgă la CFEO/CMEO.

**1.7.1. Structurarea pentru analiza de regresie**

La structurarea unui test care urmează să fie interpretat cu ajutorul analizei de regresie, considerentele importante sunt:

- (a) concentrațiile cu efect (de exemplu  $CE_{10,20,30}$ ) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie cu necesitate să fie cuprinse în test. Precizia cu care pot fi făcute estimările concentrațiilor cu efect va fi mai bună atunci când concentrația cu efect este la jumătatea intervalului de concentrații testate. În alegerea concentrațiilor adecvate pentru test este util un test preliminar de stabilire a intervalului;
- (b) pentru a permite o modelare statistică satisfăcătoare, testul trebuie să includă cel puțin un bazin martor și alte cinci bazine la concentrații diferite. Unde este cazul, atunci când se folosește un agent de dispersie, se studiază, în afară de lotul testat, un lot martor dintr-un bazin conținând agentul de dispersie la concentrația maximă testată (a se vedea punctele 1.8.3 și 1.8.4);
- (c) se poate folosi o serie geometrică sau una logaritmică adecvată (9) (a se vedea apendicele 3). Este de preferat seria logaritmică în definirea intervalelor între nivelurile concentrațiilor testate;

**▼B**

- (d) dacă sunt disponibile mai mult de șase bazine, bazinele suplimentare ar trebui folosite fie la dublarea probelor, fie la distribuirea lor în intervalele de concentrații, în scopul îngustării acestora. Ambele măsuri sunt oportune în egală măsură.

#### 1.7.2. Structurarea pentru CFEO/CMEO folosind analiza de varianță

Ar fi de preferat să existe bazine-dublură la fiecare concentrație, iar analiza statistică să se facă la nivelul fiecărui bazin (10). Fără bazine-dublură nu poate fi luată în considerare variabilitatea între bazine separat de variabilitatea de la un pește la altul. Cu toate acestea, experiența a arătat (11) că, în cazul examinat, variabilitatea între bazine a fost foarte scăzută comparativ cu cea din interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Prin urmare, o alternativă relativ acceptabilă este efectuarea analizei statistice la nivelul fiecărui exemplar.

În mod convențional, se folosesc cel puțin cinci concentrații dispuse în serie geometrică, cu o rație care de preferință nu depășește 3,2.

În general, atunci când testele se fac cu bazine-dublură, numărul bazinelor martor, și prin urmare cel al peștilor, reprezintă dublul numărului de bazine testate la fiecare concentrație, iar acesta din urmă este același la toate concentrațiile (12) (13) (14). Dimpotrivă, în absența bazinelor-dublură, numărul peștilor din lotul martor este egal cu numărul peștilor folosiți la fiecare concentrație.

Dacă analiza de varianță urmează să pornească de la bazin și nu de la fiecare pește [ceea ce ar presupune fie marcarea individuală a peștilor, fie folosirea ratelor de creștere pseudospecifice (a se vedea punctul 2.1.2)], apare necesitatea folosirii unui număr suficient de dubluri pentru a se putea determina deviația standard a „bazinelor cu aceeași concentrație”. Aceasta înseamnă că gradele de libertate pentru erorile din analiza de varianță trebuie să fie de minimum 5 (10). Dacă sunt dublate numai bazinele martor, există pericolul ca variabilitatea erorilor să fie falsificată, deoarece ea poate crește odată cu valoarea medie a ratei de creștere în cauză. Deoarece este probabil ca rata de creștere să scadă odată cu creșterea concentrației, se poate ajunge la o variabilitate supraestimată.

### 1.8. MODUL DE LUCRU

#### 1.8.1. Selectarea și cântărirea peștilor

Este important ca variația în cântărirea peștilor să fie redusă la minimum la începutul testului. În apendicele 1 se dau intervalele corespunzătoare pentru mărimea diferitelor specii recomandate în acest test. Pentru întregul lot de pești folosit, limitele greutateilor corporale individuale la începutul testului sunt, în mod ideal, cuprinse în intervalul de  $\pm 10\%$  din media aritmetică a greutateilor și, în orice caz, trebuie să nu depășească 25 %. Se recomandă cântărirea unui sub-eșantion de pești înainte de testare, pentru a estima greutatea medie.

## ▼B

Peștii nu trebuie hrăniți timp de 24 de ore înainte de începerea testului. Apoi sunt aleși la întâmplare. Folosind un anestezic general [de exemplu o soluție apoasă de 100 mg/l de metansulfonat de tricaină (MS 222) neutralizată prin adăugarea a două părți bicarbonat de sodiu la o parte de MS 222], peștii sunt cântăriți individual ca greutate *in vivo* zvântați, la precizia indicată în apendicele 1. Se rețin peștii a căror greutate se află în intervalul dorit și apoi sunt distribuiți aleator în bazine. Trebuie înregistrată greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Folosirea anestezicului, precum și manipularea peștilor (inclusiv zvântarea și cântărirea) pot să streseze și să rănească puietul, în special pe cel din speciile de talie mică. Prin urmare, manipularea puietului trebuie făcută cu cea mai mare grijă pentru a evita stresarea și rănirea animalelor de experiență.

Peștii sunt cântăriți din nou în a 28-a zi a testului (a se vedea punctul 1.8.6). Cu toate acestea, dacă se consideră necesar să fie recalculată rația alimentară, peștii pot fi cântăriți din nou în ziua a 14-a a testului (a se vedea punctul 1.8.2.3). Altă metodă, cum ar fi metoda fotografică, poate fi folosită pentru a determina schimbările în dimensiunile peștilor pe baza cărora se pot ajusta rațiile alimentare.

#### 1.8.2. Condițiile de expunere

##### 1.8.2.1. Durata

Durata testului este de 28 de zile.

##### 1.8.2.2. Rata de încărcare și densitatea populației

Este important ca rata de încărcare și densitatea populației să fie adecvate pentru specia folosită (a se vedea apendicele 1). Dacă densitatea populației este prea mare, apare stresul de supraaglomerație, conducând la reducerea ratei de creștere și, posibil, la boli. Dacă densitatea este prea mică, poate apărea un comportament teritorial care de asemenea să afecteze creșterea. În orice caz, rata de încărcare trebuie să fie suficient de redusă pentru ca o concentrație de oxigen dizolvat de cel puțin 60 % VSA să poată fi menținută fără aerare. Un test de intercalibrare (2) a arătat că, pentru păstrăvul-curcubeu, o rată de încărcare de 16 păstrăvi de 3-5 g într-un volum de 40 l este acceptabilă. Frecvența recomandată de schimbare a apei pe durata testului este de 6 l/g de pește/zi.

##### 1.8.2.3. Hrănirea

Peștelui i se administrează o alimentație corespunzătoare (apendicele 1) într-o cantitate suficientă pentru a induce o rată de creștere acceptabilă. Se veghează la evitarea proliferării microbilor și a turbidității apei. Pentru păstrăvul-curcubeu, o rație zilnică reprezentând 4 % din greutatea corporală satisface aceste condiții (2) (15) (16) (17). Rația zilnică poate fi împărțită în două porții egale și dată în două etape, la interval de cel puțin 5 ore. Rația se calculează pornind de la greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Dacă peștii sunt cântăriți din nou în ziua a 14-a, rația se recalculează în acea zi. Peștii nu sunt hrăniți timp de 24 de ore înainte de cântărire.

**▼B**

Alimentele neconsumate și materiile fecale trebuie îndepărtate zilnic din bazine, prin curățarea atentă a fundului fiecărui bazin folosind o țevă aspiratoare.

#### 1.8.2.4. *Lumina și temperatura*

Perioada în care bazinul este expus la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate speciei testate (apendicele 1).

#### 1.8.3. **Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței testate, indiferent de structurarea testului (a se vedea punctul 1.7.2). Cunoașterea prealabilă a toxicității substanței testate (de exemplu dintr-un test de toxicitate acută și din studii de determinare a intervalelor) ajută la alegerea concentrațiilor adecvate. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluției de bază, concentrația finală a acestuia nu trebuie să depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate bazinele (a se vedea punctul 1.6.3). Recurgerea la astfel de produse trebuie totuși evitată pe cât posibil.

#### 1.8.4. **Bazinele martor**

Numărul bazinelor martor cu apă de diluare depinde de structurarea testului (a se vedea punctele 1.7-1.7.2). Dacă se folosește agent de dispersie, trebuie cuprins în test și un număr de bazine martor cu agent de dispersie egal cu numărul bazinelor martor cu apă de diluare.

#### 1.8.5. **Frecvența măsurărilor și determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate (a se vedea în continuare).

La testele în regim dinamic, debitele diluantului și al soluției de bază conținând substanța toxică trebuie verificate cu regularitate, de preferință zilnic, și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Atunci când concentrațiile substanței testate se așteaptă să rămână în intervalul  $\pm 20$  % față de valoarea nominală (adică în intervalul 80-120 %; a se vedea punctele 1.6.2 și 1.6.3), se recomandă minimal analiza celei mai ridicate și a celei mai scăzute concentrații la începutul testului, iar apoi la intervale de o săptămână. În cazul testului la care concentrația substanței testate nu se așteaptă a rămâne în intervalul  $\pm 20$  % față de valoarea nominală (pe baza datelor de stabilitate privind substanța testată), este necesară analizarea tuturor concentrațiilor, dar urmând același procedeu.

La testele în regim semistatic (cu schimbarea apei) unde concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul  $\pm 20$  % față de valoarea nominală, se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei la începutul studiului și săptămânal după aceea. La testele unde concentrația substanței testate nu este de așteptat să rămână în intervalul  $\pm 20$  % față de valoarea nominală, trebuie analizate toate concentrațiile urmând aceeași metodă ca și pentru substanțele mai stabile.

**▼B**

Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul  $\pm 20\%$  față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate.

Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu cu ajutorul unui filtru cu pori de  $0,45\ \mu\text{m}$ ) sau centrifugarea lor. Centrifugarea este metoda recomandată. Cu toate acestea, dacă mediul de lucru nu se adsorbe pe filtru, filtrarea este în egală măsură acceptabilă.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală, alcalinitatea și salinitatea se măsoară (dacă are relevanță) în bazinele martor și în bazinul cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la început, la jumătatea și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul se măsoară la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea și alcalinitatea se măsoară o dată la fiecare test. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul din bazine.

#### 1.8.6. **Observații**

Greutatea: la sfârșitul testului toți peștii supraviețuitori trebuie cântăriți *in vivo* zvântați (*blotted dry*), fie în grupuri pe fiecare bazin, fie individual. Cântărirea în grup este preferată cântărilor individuale, care necesită marcarea individuală a peștilor. În cazul măsurării greutatei individuale în scopul determinării ratei de creștere specifice individuale, tehnica de marcarea aleasă trebuie să evite stresarea animalelor (se poate folosi o metodă diferită de metoda crio-marcajului, de exemplu un fir de undiță subțire, colorat).

Peștii sunt examinați zilnic pe durata testului și se observă orice anomalii exterioare (cum ar fi hemoragia, decolorarea) și comportamente anormale. Se înregistrează cazurile de deces și se îndepărtează peștii morți cât mai repede posibil. Peștii morți nu sunt înlocuiți, rata de încărcare și densitatea populației fiind suficiente pentru a evita efectele asupra creșterii provocate de schimbarea numărului de pești din bazin. Este necesar totuși să se ajusteze rația alimentară.

## 2. **DATE ȘI RAPORT**

### 2.1. **PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea, cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de bazine, de concentrații folosite, de pești etc. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.



**▼ B**

Ratele de creștere nu se calculează pentru bazinele în care mortalitatea depășește 10 %. Cu toate acestea, rata mortalității trebuie indicată la toate concentrațiile folosite.

Oricare din metode este folosită la analizarea rezultatelor, conceptul central este rata  $r$  de creștere specifică între momentul  $t_1$  și momentul  $t_2$ . Aceasta poate fi definită în câteva moduri, în funcție de prezența sau absența marcajului individual al peștilor sau în funcție de necesitatea aflării unei medii pe bazin.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

unde:

$r_1$  = rata de creștere specifică individuală

$r_2$  = rata de creștere specifică medie a bazinului

$r_3$  = rata de creștere pseudospecifică

$w_1, w_2$  = greutatea corporale ale unui anumit pește la momentele  $t_1$  și respectiv  $t_2$

$\log_e w_1$  = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la începutul perioadei de studiu

$\log_e w_2$  = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la sfârșitul perioadei de studiu

$\log_e W_1$  = media logaritmilor valorilor  $w_1$  pentru peștii din bazin la începutul perioadei de studiu

$\log_e W_2$  = media logaritmilor valorilor  $w_2$  pentru peștii din bazin la sfârșitul perioadei de studiu

$r_1, r_2, r_3$  pot fi calculate pentru perioada cuprinsă între ziua 0 și ziua 28 și acolo unde este cazul (adică atunci când s-a făcut o măsurătoare în ziua 14) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 14 și ziua 14 și ziua 28.

#### 2.1.1. **Analiza rezultatelor prin regresie (modelarea concentrație-răspuns)**

Această metodă de analiză stabilește o relație matematică adecvată între ratele de creștere specifice și concentrație, ceea ce permite estimarea mărimii „CE<sub>x</sub>”, adică orice valoare CE necesară. Folosind această metodă nu mai este necesar calculul mărimii  $r$  pentru fiecare pește ( $r_1$ ) și în schimb analiza pornește de la valoarea medie pe bazin a lui  $r$  ( $r_2$ ). Această ultimă metodă este preferabilă. În plus, este și mai adecvată în cazul speciilor de talie mică.

Pentru a studia relația concentrație-răspuns, ratele de creștere specifice medii ale bazinelor ( $r_2$ ) se așează pe un grafic ca funcție de valorile concentrațiilor.

**▼B**

Pentru exprimarea relației dintre  $r_2$  și concentrație trebuie ales modelul adecvat, iar alegerea trebuie susținută de o justificare pertinentă.

Dacă peștii supraviețuitori sunt în număr diferit de la un bazin la altul, atunci procesul de ajustare a modelului, fie acesta simplu sau nelinear, se ponderează pentru a lua în considerare mărimile diferite ale grupurilor.

Metoda de ajustare a modelului trebuie să facă posibilă estimarea, de exemplu, a valorii  $CE_{20}$  și a dispersiei sale (fie eroare standard, fie interval de încredere). Graficul modelului ajustat este prezentat în relație cu rezultatele, așa încât să poată fi apreciat gradul de adecvare a modelului (8) (18) (19) (20).

### 2.1.2. Analiza rezultatelor pentru estimarea DME0

Dacă testul a cuprins bazine-dublu la toate nivelurile de concentrație, estimarea CME0 poate fi făcută pe baza analizei de varianță a ratei de creștere specifice medii a bazinului (a se vedea punctul 2.1), urmată de o metodă pertinentă [de exemplu testul Dunnett sau testul William (12) (13) (14) (21)] de comparare a  $r$  medii corespunzătoare fiecărei concentrații cu  $r$  medie din bazinele martor, pentru a identifica valoarea cea mai scăzută a concentrației pentru care diferența este semnificativă la nivelul de probabilitate de 0,05. Dacă nu sunt îndeplinite condițiile impuse pentru metodele parametrice – distribuție nenormală (de exemplu testul Shapiro-Wilk) sau varianță heterogenă (testul Barlett) – trebuie luată în considerare transformarea datelor, în scopul omogenizării varianțelor înainte de efectuarea analizei de varianță, sau efectuarea unei analize de varianță ponderate.

Dacă testul nu a cuprins bazine-dublu la fiecare concentrație, o analiză de varianță pe baza rezultatelor pe bazin va fi insensibilă sau imposibilă. În această situație, un compromis acceptabil este să se efectueze analiza pornind de la rata de creștere pseudospecifică  $r_3$  pentru fiecare pește.

$r_3$  medie de la fiecare nivel de concentrație se compară cu  $r_3$  medie din cazul bazinelor martor. CME0 poate fi identificată ca mai sus. Trebuie admis că această metodă nu ia în considerare variabilitatea între bazine în afară de ce se poate explica prin variabilitatea între pești, tratați individual, și nici nu oferă protecție în acest sens. Cu toate acestea, experiența a arătat (8) că variabilitatea între bazine a fost foarte mică în comparație cu variabilitatea în interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Dacă analiza nu cuprinde fiecare pește, trebuie să se prezinte metoda de identificare a valorilor aberante și justificarea folosirii ei.

### 2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice sau, la testele în regim semistatic, atunci când concentrația substanței testate scade între momentul preparării soluției și momentul schimbării apei.

### 2.3. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

**▼B****2.3.1. Substanța testată:**

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;
- datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate, după caz.

**2.3.2. Specia testată:**

- numele științific, dacă este posibil;
- sușa, mărimea, furnizorul, eventuale tratamente prelabile etc.

**2.3.3. Condițiile de testare:**

- metoda folosită (de exemplu: regim semistatic/schimbarea apei, regim dinamic, încărcare, densitatea populației etc.);
- structurarea testului (de exemplu: număr de bazine, concentrații folosite și dubluri, număr de pești pe bazin);
- metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (se specifică agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);
- concentrațiile nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile lor standard în bazine și metoda prin care au fost obținute, precum și date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrația substanței testate în soluția reală;
- caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;
- calitatea apei din bazine: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;
- informații detaliate despre alimentație [de exemplu tipul alimentului (alimentelor), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

**2.3.4. Rezultatele:**

- date demonstrând că loturile din bazinele martor au îndeplinit criteriile de validitate referitoare la supraviețuire și date privind mortalitatea de la fiecare nivel de concentrație;
- tehnicile de analiză statistică folosite, statistici întemeiate pe bazine-dublură sau pe fiecare pește, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor folosite;
- date tabelare privind greutatea corporale individuale și medii din zilele 0, 14 (dacă se măsoară) și 28, valorile ratelor de creștere specifice medii ale bazinelor sau pseudospecifice (după caz) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 28 sau, posibil, dintre ziua 0 și ziua 14 și dintre ziua 14 și ziua 28;
- rezultatele analizei statistice (adică analiza prin regresie sau de varianță), de preferat în formă tabelară și grafică și CME<sub>0</sub> ( $p = 0,05$ ) și CFEO sau CE<sub>x</sub> cu erori standard când este posibil, după caz;

**▼B**

— incidența oricăror reacții neobișnuite a peștilor și orice efecte vizibile provocate de substanța testată.

## 3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
2. Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
3. Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, p. 1855-1870.
4. Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, p. 157-164.
5. Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
6. Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, p. 287-297.
7. Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
8. Stephan C.E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328-338.
9. Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, p. 81.
10. Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
11. Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
12. Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, p. 1096-1121.
13. Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, p. 482-491.

## ▼B

14. Williams D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, p. 103-117.
15. Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994), A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, p. 123-133.
16. Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990), The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, p. 33-41.
17. Post, G. (1987), Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
18. Bruce, R. D. and Versteeg D.J. (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, p. 1485-1494.
19. DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989), Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
20. Norbert-King T. J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. p. 12.
21. Williams D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, p. 510-531.

## Apendice 1

## SPECIILE DE PEȘTI RECOMANDATE PENTRU TESTARE ȘI CONDIȚIILE DE LUCRU ADECVATE

| Specia   | Intervalul de temperatură recomandat ( °C) | Perioada de expunere la lumină (ore) | Intervalul recomandat pentru greutatea inițială a peștilor (g) | Precizia obligatorie a măsurărilor | Rata de încărcare (g/l) | Densitatea populației (pe litru) | Alimentația   | Durata testului (zile) |
|--|--|--------------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---|------------------------|
| <b>Specii recomandate:</b>                     |  |                                      |  |                                    |                         |                                  |   |                        |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i><br>păstrăv-curcubeu | 12,5 - 16,0                                | 12-16                                | 1-5  | până la 100 mg                     | 1,2 - 2,0               | 4                                | Hrană uscată din larve salm-onide (produsă sub licență) | ≥ 28                   |
| <b>Alte specii bine studiate:</b>              |  |                                      |  |                                    |                         |                                  |   |                        |
| <i>Danio rerio</i><br>Pește-lezebră            | 21-25                                      | 12-16                                | 0,050 - 0,100  | până la 1 mg                       | 0,2 - 1,0               | 5-10                             | Hrană vie ( <i>Brachionus Artemia</i> )                 | ≥ 28                   |
| <i>Oryzias latipes</i><br>Medaka               | 21-25                                      | 12-16                                | 0,050 - 0,100  | până la 1 mg                       | 0,2 - 1,0               | 5-20                             | Hrană vie ( <i>Brachionus Artemia</i> )                 | ≥ 28                   |

**▼B***Apendice 2***UNELE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUARE  
ACCEPTABILE**

| SUBSTANȚA  | CONCEN-<br>TRAȚIILE |
|--|---------------------|
| materie în particule                                       | < 20 mg/l           |
| carbon organic total                                       | < 2 mg/l            |
| amoniac neionizat  | < 1 µg/l            |
| clor rezidual  | < 10 µg/l           |
| pesticide organofosforice totale                           | < 50 ng/l           |
| pesticide organoclorice totale plus bifenili policlorinați | < 50 ng/l           |
| clor organic total   | < 25 ng/l           |



## Apendice 3

## Seriile logaritmice ale concentrațiilor adecvate pentru testul de toxicitate (9)

| Coloană (număr de concentrații între 100 și 10 sau între 10 și 1) (*) |     |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |
| 100   | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32  | 46  | 56  | 63  | 68  | 72  | 75  |
| 10  | 22  | 32  | 40  | 46  | 52  | 56  |
| 3,2   | 10  | 18  | 25  | 32  | 37  | 42  |
| 1,0   | 4,6 | 10  | 16  | 22  | 27  | 32  |
|   | 2,2 | 5,6 | 10  | 15  | 19  | 24  |
|   | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10  | 14  | 18  |
|   |     | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10  | 13  |
|   |     | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10  |
|   |     |     | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
|   |     |     | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
|   |     |     |     | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
|   |     |     |     | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
|   |     |     |     |     | 1,4 | 2,4 |
|   |     |     |     |     | 1,0 | 1,8 |
|   |     |     |     |     |     | 1,3 |
|   |     |     |     |     |     | 1,0 |

(\*) Dintr-o coloană poate fi aleasă o serie de cinci (sau mai multe) concentrații. Punctele de mijloc dintre concentrațiile din coloana (x) se găsesc în coloana (2x + 1). Valorile enumerate pot să reprezinte concentrații exprimate ca procente greutate pe unitatea de volum (mg/l sau µg/l). Valorile pot fi înmulțite sau împărțite cu orice putere a lui 10, după caz. Coloana 1 poate fi folosită dacă există o incertitudine semnificativă asupra nivelului de toxicitate.





## C.15. PEȘTII, TESTUL DE TOXICITATE PE TERMEN SCURT ÎN STADIILE DE EMBRION ȘI DE ALEVIN

### 1. METODĂ

Această metodă de testare a toxicității pe termen scurt reproduce Orientarea 212 (1998) a OCDE.

#### 1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate pe termen scurt în stadiile de embrion și de alevin ale peștilor este un test în care sunt expuse toxicității stadiile de dezvoltare între începutul stadiului de ou fertilizat și sfârșitul stadiului de alevin. În acest test nu se administrează hrană și testul trebuie să se încheie când alevinii sunt încă hrăniți din sacul vitelin.

Testul urmărește să definească efectele letale și, în măsură limitată, efectele subletale ale produselor chimice asupra stadiilor de dezvoltare ale speciilor testate. Acest test furnizează informații utile, putând (a) să formeze o punte între testele letale și subletale, (b) să fie folosit ca test preliminar fie pentru un test de toxicitate complet în stadiile de viață timpurii, fie pentru testele de toxicitate cronică și (c) să fie folosit la testarea speciilor acolo unde tehnicile de creștere a animalelor de experiență nu sunt suficient de avansate pentru a acoperi perioada de trecere de la alimentația endogenă la cea exogenă.

Trebuie știut că numai testele care acoperă toate stadiile din ciclul de viață a peștelui sunt în general în măsură să prezinte o estimare corectă a toxicității cronice la pește a produselor chimice și orice expunere care omite vreunul din stadii poate reduce sensibilitatea și astfel poate subestima toxicitatea cronică. Prin urmare, este de așteptat ca testul pe embrioni și alevini să fie mai puțin sensibil decât un test complet în stadiile de viață timpurii, în special în privința produselor chimice puternic lipofile ( $\log P_{ow} > 4$ ) și a celor având un mod specific de acțiune toxică. Cu toate acestea, este de așteptat ca diferențele de sensibilitate între cele două teste să fie mai mici în cazul produselor cu mod de acțiune nespecific, narcotic (1).

Înainte de publicarea acestui test, cea mai mare parte a experienței legate de testul pe embrioni și alevini s-a obținut cu peștii de râu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – nume popular pește-zebră). Mai multe îndrumări detaliate asupra modului de lucru în cazul acestei specii sunt prezentate în apendicele 1. Aceasta nu exclude folosirea altor specii în cazul cărora există experiență acumulată (tabelele 1A și 1B)

#### 1.2. DEFINIȚII

**Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO):** este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la  $p < 0,05$ ) în comparație cu lotul martor. Cu toate acestea, toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

**Concentrația fără efecte observabile (CFEO):** este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

**▼B****1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Embrionii și alevinii sunt expuși la o serie de concentrații ale substanței testate dizolvate în apă. Protocolul de testare permite alegerea între regimul semistatic și cel dinamic. Alegerea depinde de natura substanței testate. Testul începe prin așezarea ouălor fertilizate în incintele experimentale și se încheie imediat înainte ca sacul vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inaniție la loturile martor. Efectele letale și subletale sunt evaluate și comparate cu valorile din loturile martor, pentru a determina concentrația minimă cu efect observabil și, de aici, concentrația fără efect observabil. O altă metodă este analiza folosind un model de regresie în scopul de a estima concentrația care ar provoca o variație procentuală dată (adică  $CL/CE_x$ , unde  $x$  este definit ca % variație).

**1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ**

Ar trebui să fie disponibile rezultatele testului de toxicitate acută (a se vedea metoda C.1), de preferință efectuat pe specii alese pentru prezentul test. Rezultatele pot fi utile în alegerea intervalului adecvat de concentrații de lucru la testul în stadiile de viață timpurii. Ar trebui cunoscute solubilitatea în apă (inclusiv solubilitatea în apa folosită la test) și presiunea vaporilor substanței testate. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței în soluții testate, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și menționate în raport.

Informațiile asupra substanței testate care sunt utile în fixarea condițiilor de lucru cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

**1.5. VALIDITATEA TESTULUI**

Pentru ca testul să fie valid, trebuie îndeplinite următoarele condiții:

- supraviețuirea globală a ouălor fertilizate în loturile martor și, unde este cazul, în incintele conținând solvent, dar fără substanță testată, trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în apendicele 2 și 3;
- concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie între 60 % și 100 % din valoarea de saturație în aer (VSA), pe toată durata testului;
- temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1,5$  °C între incintele experimentale sau între zilele succesive în orice moment al testului și trebuie să fie în intervalele de temperatură specificate pentru specia testată (apendicele 2 și 3).

**▼B****1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Incintele experimentale**

Pot fi folosite orice recipiente de sticlă sau din alt material chimic inert. Dimensiunile recipientelor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite respectarea ratei de încărcare (a se vedea punctul 1.7.1.2). Se recomandă poziționarea aleatoare a incintelor în laborator. La dispunerea incintelor, o schemă de randomizare a blocurilor de incinte, fiecare tratament fiind reprezentat în fiecare bloc, este preferabilă unei scheme de randomizare integrală a incintelor, dacă în laborator există efecte sistematice care pot fi controlate folosind gruparea incintelor. Gruparea în blocuri, dacă se folosește, trebuie să fie luată în considerare în analiza ulterioară a rezultatelor. Incintele experimentale trebuie protejate de orice perturbare nedorită.

**1.6.2. Alegerea speciilor de pești**

Speciile de pești recomandate sunt prezentate în tabelul 1A. Aceasta nu exclude folosirea altor specii (exemple sunt prezentate în tabelul 1B), dar modul de lucru trebuie adaptat pentru a asigura condiții corespunzătoare. În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

**1.6.3. Îngrijirea peștilor reproducători**

Detalii despre îngrijirea populației de pești reproducători în condiții satisfăcătoare se găsesc în Orientarea 210 a OCDE <sup>(1)</sup> și în referințele bibliografice 2, 3, 4, 5 și 6.

**1.6.4. Manipularea embrionilor și a larvelor**

Embrionii și larvele pot fi puse, în interiorul cuvei principale, în recipiente mai mici, cu laturile sau extremitățile din plasă, pentru a permite curgerea soluției prin recipient. Curgerea neturbulentă prin aceste recipiente mici poate fi indusă prin atașarea lor la un braț mobil, care deplasează vertical recipientele, dar așa încât să mențină organismele imersate; se poate folosi de asemenea un sistem sifon. Ouăle fertilizate de salmonide pot fi puse pe suporturi sau site cu ochiul suficient de mare pentru a permite larvelor să traverseze după eclozare. Folosirea pipetelor Pasteur este oportună pentru îndepărtarea embrionilor și a larvelor în testele semistatice cu schimbarea zilnică și completă a apei (a se vedea punctul 1.6.6).

Când au fost folosite recipiente, site sau plase pentru a păstra ouăle în cuva principală, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor <sup>(2)</sup>, cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica peștii să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer și nu trebuie folosite minciocuri pentru a scoate peștii din recipientele conținând ouăle (aceste precauții nu sunt necesare în cazul speciilor mai puțin fragile, cum este crapul). Momentul transferului variază în funcție de specie și transferul nu este întotdeauna necesar. În regim semistatic se pot folosi pahare de laborator sau vase cu înălțimea redusă și, dacă este necesar, echipate cu o sită la mică distanță de fundul paharului. Dacă volumul acestor recipiente este suficient pentru a respecta cerințele de încărcare (a se vedea 1.7.1.2) nu este necesar transferul embrionilor și larvelor.

<sup>(1)</sup> OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

<sup>(2)</sup> Rezultatele acestor teste între laboratoare, precum și un coringendum tehnic la ISO 6341 oferă un CE<sub>50</sub> la 24 h al dicromatului de potasiu (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) cuprins în intervalul 0,6-1,7 mg/l.

**▼B****1.6.5. Apa**

Este corespunzătoare pentru test orice apă care respectă caracteristicile chimice ale unei ape de diluare enumerate în apendicele 4 și în care supraviețuirea loturilor martor din specia testată este cel puțin la fel de bună ca aceea prezentată în apendicele 2 și 3. Apa trebuie să își mențină calitatea constantă pe durata testului. pH-ul trebuie să rămână în intervalul de  $\pm 0,5$  unități. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin complexare cu substanța testată) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară, de exemplu, la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu: Ca, Mg, Na, K, Cl și  $\text{SO}_4$ ), pesticide (de exemplu pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu la fiecare șase luni).

**1.6.6. Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate). Folosirea solvenților sau a agenților de dispersie trebuie evitată pe cât posibil; totuși, în unele cazuri, astfel de compuși pot fi necesari pentru a produce o soluție de bază cu o concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilenglicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili (de exemplu acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește un agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra supraviețuirii și nici efecte adverse vizibile asupra stadiilor de viață timpurii.

La testele în regim semistatic, pot fi adoptate două moduri de lucru diferite: fie (i) se prepară soluții de lucru noi în recipiente curate, iar ouăle și larvele sunt transferate cu grijă în noile recipiente, într-un volum mic din vechea soluție evitând expunerea la aer fie (ii) organismele sunt păstrate în recipientele inițiale în timp ce o fracțiune (cel puțin trei sferturi) din apa de testare este schimbată. Frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminară (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80-120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic. În oricare dintre cazuri, trebuie evitată stresarea larvelor în timpul operațiunii de schimbare a apei.

**▼B**

La teste în regim dinamic este necesar un sistem care să dozeze și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare trebuie verificate la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin cinci volume de incintă în 24 de ore s-a dovedit adecvat (2).

## 1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI

Informații utile despre desfășurarea testelor pe embrioni de pește și alevini sunt disponibile în literatură, unele exemple fiind incluse în referințele bibliografice din prezentul text (7) (8) (9).

### 1.7.1. Condițiile de expunere

#### 1.7.1.1. Durata

Testul este recomandabil să înceapă în următoarele 30 de minute după fertilizarea ouălor. Embrionii sunt imersați în soluția testată înainte sau cât de curând după începerea fazei de segmentare a blastodiscului și în orice caz înainte de debutul fazei de gastrulă. În cazul ouălor obținute de la furnizori comerciali, s-ar putea să nu fie posibilă începerea testului imediat după fertilizare. Deoarece amânarea începerii testului poate influența puternic sensibilitatea acestuia, testul trebuie inițiat în următoarele opt ore după fertilizare. Deoarece larvele nu sunt hrănite pe durata expunerii, testul trebuie să se încheie imediat înainte ca sacul vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inanție la loturile martor. Durata depinde de specia folosită. Câteva durate recomandate sunt prezentate în apendicele 2 și 3.

#### 1.7.1.2. Încărcarea

Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie suficient pentru a îndeplini condițiile statistice. Ele trebuie distribuite aleator între tratamente și trebuie folosite la fiecare concentrație cel puțin 30 de ouă, împărțite în loturi egale (sau cât mai uniforme numeric, deoarece poate fi dificil să se obțină loturi egale când se folosesc unele specii) în cel puțin trei incinte identice. Rata de încărcare (biomasă pe volum de soluție de lucru) trebuie să fie suficient de scăzută pentru ca o concentrație a oxigenului dizolvat de minimum 60 % VSA să se poată menține fără aerare. La teste în regim dinamic a fost recomandată (2) o rată de încărcare nedepășind 0,5 g/l în 24 de ore și nedepășind 5 g/l de soluție în orice moment.

#### 1.7.1.3. Lumina și temperatura

Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2 și 3). În scopul monitorizării temperaturii, poate fi adecvată folosirea unui recipient martor suplimentar.

**▼B****1.7.2. Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci valori de concentrații ale substanței testate, aflate în progresie geometrică cu o rație care să nu depășească 3,2. La alegerea intervalului de concentrații trebuie luată în considerare curba reprezentând  $CL_{50}$  în funcție de expunere, rezultată din studiul de toxicitate acută. Folosirea a mai puțin de cinci concentrații, de exemplu în testele la valori-limită, și un interval mai îngust se pot dovedi adecvate în unele cazuri. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Nu este necesară testarea concentrațiilor mai ridicate fie de  $CL_{50}$  la 96 de ore, fie mai ridicate de 100 mg/l (care valoare este mai scăzută dintre acestea) Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluțiilor (a se vedea punctul 1.6.6), concentrația finală a acestuia în recipiente trebuie să nu depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate recipientele.

**1.7.3. Loturile martor**

În paralel cu loturile tratate trebuie să fie studiate și loturile dintr-o incintă cu apă de diluare (cu dublură, dacă este cazul) și, dacă prezintă relevanță, dintr-o incintă cu agent de dispersie (cu dublură, dacă este cazul).

**1.7.4. Frecvența măsurărilor și a determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate.

La testele în regim semistatic în care concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul  $\pm 20\%$  față de valoarea nominală (adică în intervalul 80-120 %; a se vedea punctele 1.4 și 1.6.6), se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și la schimbarea apei de cel puțin trei ori, la intervale egale pe durata testului (adică analizele trebuie efectuate pe o probă din aceeași soluție, o dată când este proaspăt preparată și o dată înainte de schimbarea apei).

La testele în care concentrațiile nu este de așteptat să rămână în intervalul  $\pm 20\%$  față de valoarea nominală (pe baza datelor referitoare la stabilitatea substanței), trebuie analizate toate concentrațiile imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei, dar urmând aceeași metodă (adică de cel puțin trei ori la intervale egale pe durata testului. Determinarea concentrațiilor substanței testate înainte de schimbarea apei este suficient să fie făcută numai la un singur recipient la fiecare concentrație. Determinările trebuie să nu fie făcute la intervale mai lungi de șapte zile. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul  $\pm 20\%$  față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate inițial.

La testele în regim dinamic este adecvat un sistem de prelevare a probelor similar cu acela prescris pentru regimul semistatic (dar măsurarea soluțiilor „vechi” nu se aplică în acest caz). Cu toate acestea, dacă durata testului este mai mare de șapte zile, este recomandabilă creșterea numărului de prelevări în prima săptămână (de exemplu trei seturi de măsurători) pentru a se asigura stabilitatea concentrațiilor.

**▼B**

Se poate dovedi necesară centrifugarea probelor sau filtrarea lor (de exemplu cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 µm). Cu toate acestea, deoarece se pare că nici centrifugarea nici filtrarea nu separă întotdeauna fracția non-biodisponibilă a substanței testate de fracțiunea biodisponibilă, se poate dovedi inutilă supunerea probelor la aceste tratamente.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară în incintele martor și în incinta cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la începutul, la jumătatea și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul trebuie măsurat la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea trebuie măsurată o dată la fiecare test. Temperatura se măsoară zilnic și este de preferat să fie monitorizată continuu cel puțin într-una din incinte.

#### 1.7.5. **Observații**

##### 1.7.5.1. *Stadiul dezvoltării embrionare*

Stadiul embrionar (adică stadiul de gastrulă) la începutul expunerii la substanța testată trebuie verificat cât mai exact posibil. Aceasta se poate face folosind un eșantion reprezentativ de ouă păstrate corespunzător și curățate până devin translucide. Pentru descrierea și ilustrarea stadiilor embrionare se poate consulta și literatura (2) (5) (10) (11).

##### 1.7.5.2. *Eclozarea și supraviețuirea*

Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să fie făcute cel puțin o dată pe zi și numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. La începutul testului este de dorit ca observațiile să fie mai frecvente (de exemplu la fiecare 30 de minute în primele trei ore), deoarece în unele cazuri timpul de supraviețuire este mai relevant decât numărul deceselor (de exemplu când există efecte toxice acute). Embrionii și larvele moarte trebuie îndepărtate imediat ce sunt observate, fiindcă se pot descompune rapid. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu răni sau leza ouăle/larvele din vecinătate, acestea fiind extrem de delicate și de sensibile. Simptomele care indică moartea organismului variază în funcție de stadiul de viață:

- **pentru ouă:** în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a translucidității și schimbarea colorației, provocată de coagularea și precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;
- **pentru embrioni:** absența mișcărilor corpului și absența bătăilor inimii și decolorarea opacă la speciile ai căror embrioni sunt în mod normal translucizi;
- **pentru larve:** imobilitatea și absența mișcărilor respiratorii și absența bătăilor inimii și colorația alb-opacă a sistemului nervos central și absența reacției la stimuli mecanici.

**▼B**1.7.5.3. *Aspectul anormal*

Numărul larvelor prezentând anomalii ale formei corpului și pigmentare, precum și stadiul absorbției sacului vitelin trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului și de natura anomaliilor în cauză. Trebuie spus că embrioni și larve anormale apar în mod natural și numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile martor ale unor specii. Animalele anormale nu trebuie îndepărtate din recipiente decât atunci când mor.

1.7.5.4. *Comportamentul anormal*

Anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat și imobilitatea neobișnuită, trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului. Aceste efecte, deși dificil de cuantificat, pot, atunci când sunt ținute sub observație, să ajute la interpretarea datelor privind mortalitatea, adică pot furniza informații despre modul de acțiune toxică a substanței.

1.7.5.5. *Lungimea*

La sfârșitul testului se recomandă măsurarea lungimilor individuale; poate fi folosită oricare din lungimile standard, până la scobitura caudală sau totală. Cu toate acestea, dacă se constată o putrefacție sau o rosătură la înotătoarea caudală, se folosesc lungimile standard. În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este  $\leq 20\%$ .

1.7.5.6. *Greutatea*

La încheierea testului poate fi măsurată greutatea corporală individuală; greutatea organismului uscat (24 de ore la 60 °C) este preferată greutății *in vivo* (pește zvântat). În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este  $\leq 20\%$ .

Aceste observații pun la dispoziția analizei statistice totalitatea datelor următoare sau unele dintre acestea:

- mortalitatea cumulată;
- numărul larvelor sănătoase la încheierea testului;
- momentele de început și sfârșit al eclozării (adică 90 % ouă eclozate în fiecare incintă de la același nivel al concentrației);
- numărul larvelor eclozate în fiecare zi;
- lungimea (și greutatea) animalelor supraviețuitoare la încheierea testului;
- numărul larvelor cu diformități sau cu aspect anormal;
- numărul larvelor prezentând comportament anormal.



**▼B****2. DATE ȘI RAPORT****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de incinte experimentale și de concentrații folosite, în numărul inițial de ouă fertilizate și în parametrii măsurăți. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.

Dacă urmează să fie estimate CMEO/CFEO, este necesar ca variațiile să fie estimate în cadrul fiecărui set de incinte de la aceeași concentrație, folosind analiza de variație sau metodele tabelor de contingență. Metoda Dunnett se poate dovedi folositoare (12) (13) pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și rezultatele obținute în legătură cu loturile martor. De asemenea sunt disponibile și alte exemple utile (14) (15). Mărimea efectului detectabil folosind analiza de varianță sau alte metode (adică puterea testului) trebuie calculată și menționată în raport. Trebuie spus că nu toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6 sunt adecvate pentru analiza statistică de varianță. De exemplu, mortalitatea cumulată și numărul larvelor sănătoase la încheierea testului pot fi analizate folosind metode probit.

Dacă urmează să fie estimate CL/CE<sub>x</sub>, una sau mai multe curbe, cum ar fi curba logistică, trebuie ajustate la datele studiate folosind o metodă precum metoda celor mai mici pătrate sau metoda celor mai mici pătrate neliniare. Curba (curbele) trebuie parametrizate astfel încât CL/CE<sub>x</sub> studiate și eroarea standard respectivă să poată fi estimate direct. Aceasta va ușura mult calculul intervalului de încredere din jurul CL/CE<sub>x</sub>. Dacă nu sunt motive întemeiate să fie preferate alte niveluri de încredere, ar trebui alese nivelurile de 95 % la ambele capete ale intervalului. Este de preferat ca metoda de ajustare să asigure un mijloc de a evalua semnificația neajustării. Pot fi folosite metode grafice de ajustare a curbilor. Analiza prin regresie este adecvată pentru toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6.

**2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice. Rezultatele se interpretează de asemenea cu precauție în cazul concentrațiilor mai mari decât solubilitatea în apă a substanței.

**2.3. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

**2.3.1. Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante,

— datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței, după caz.

**▼B****2.3.2. Specia testată:**

- numele științific, sușa, numărul peștilor parentali (câte femele au fost folosite pentru a asigura numărul necesar de ouă), sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

**2.3.3. Condițiile de testare:**

- metoda folosită (de exemplu: regim semistatic, regim dinamic, timpul scurs de la fertilizare până la începerea testului, încărcare etc.);
- perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- structurarea testului (de exemplu: număr de incinte și de dubluri, număr de embrioni pe incintă);
- metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (trebuie specificat agentul de solubilizare și concentrația acestuia, dacă se folosește);
- concentrațiile de lucru nominale, valorile măsurate, mediile lor și deviațiile lor standard în recipiente și metoda prin care au fost obținute, precum și, dacă substanța testată este solubilă în apă la concentrații mai reduse decât cele testate, date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței testate în soluție reală;
- caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;
- calitatea apei din recipiente: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat.

**2.3.4. Rezultatele:**

- rezultatele oricărui studii preliminare referitoare la stabilitatea substanței testate;
- date demonstrând că loturile din incintele martor au îndeplinit standardul de supraviețuire globală acceptabilă al speciei testate (apendicele 2 și 3);
- rezultate despre mortalitate/supraviețuire în stadiile de embrion și larvă și mortalitatea/supraviețuirea globală;
- zilele de eclozare și numărul eclozărilor;
- lungimea (și greutatea) corporală;
- incidența și descrierea anomaliilor morfologice, dacă există;
- incidența și descrierea efectelor comportamentale, dacă există;
- analiza statistică și prelucrarea datelor;
- la testele analizate folosind analiza de varianță, concentrația minimă cu efecte observabile (CME0) la  $p = 0,05$  și concentrația fără efecte observabile (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat, inclusiv descrierea metodelor statistice folosite și indicarea mărimii efectului care poate fi detectat;

**▼B**

— la testele analizate folosind analiza prin regresie, CL/CE<sub>x</sub> și intervalele de încredere, precum și un grafic al modelului ajustat folosit în calcule;

— explicații pentru orice abatere de la această metodă de testare.

### 3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, p. 60, June 1990.
2. ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. p. 26.
3. Brauhn J. L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
4. Brungs W. A. and Jones B. R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
5. Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 121-173.
6. Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, p. 328-330.
7. Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, p. 61-71.
8. Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 807-821.
9. Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, p. 129-145.
10. Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
11. Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina, p. 36.
12. Dunnett C. W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.
13. Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.
14. Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

## ▼B

15. Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, p. 321-334.
16. Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, p. 81.
17. Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, p. 126-134.
18. Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: p. 231-236.
19. Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, p. 19-28.
20. US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
21. US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
22. De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, p. 1189-1203.
23. Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
24. Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, p. 280.
25. Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, In: W. S. Hoar and D. J. Randall Eds., *Fish Physiology*, vol. XIA, Academic press, p. 1-58.

## Tabelul 1a

## Specii de pești recomandate pentru testare

## APĂ DULCE

*Oncorhynchus mykiss*

Păstrăv-curcubeu (9) (16)

*Danio rerio*

Pește-zebră (7) (17) (18)

*Cyprinus caprio*

Crap (8) (19)

*Oryzias latipes*

Medaka (20) (21)

*Pimephales promelas* (8) (22)



Tabelul 1b

## Exemple de alte specii de pești bine studiate care au fost folosite

| APĂ DULCE                                   | APĂ SĂRATĂ                                  |
|---|---|
| <i>Carassius auratus</i><br>Caras auriu (8) | <i>Menidia peninsulae</i><br>(23) (24) (25) |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (8)              | <i>Clupea harengus</i><br>Herring (24) (25) |
|   | <i>Gadus morhua</i><br>Cod (24) (25)        |
|   | <i>Cyprinodon variegatus</i> (23) (24) (25) |



### Apendicele 1

## GHID PENTRU EFECTUAREA UNUI TEST DE TOXICITATE LA EMBRIONI ȘI ALEVINI DE PEȘTE-ZEBRĂ (*BRACHYDANIO RERIO*)

### INTRODUCERE

Peștele zebură provine de pe coasta Coromandel din India unde trăiește în apele repezi. Este un pește obișnuit de acvariu din familia crapului și datele referitoare la creșterea și îngrijirea acestuia se pot găsi în cărțile de specialitate privind peștii tropicali. Laale descrie biologia și utilizarea acestuia în studiul privind peștii (1).

Acest pește are rareori o lungime mai mare de 45 cm. Corpul este cilindric cu 7-9 dungi argintii orizontale de culoare albastru închis. Aceste dungi ajung până la înotătoarele caudale și anale. Spatele este de culoare verde-măsliniu. Masculii sunt mai subțiri decât femelele. Femelele sunt mai argintii și abdomenul este umflat, în special înainte de depunerea icrelor.

Peștii adulți pot să suporte fluctuații mari de temperatură, pH și duritate a apei. Cu toate acestea, pentru a obține pești sănătoși care să producă icre de bună calitate, trebuie asigurate condiții optime.

În timpul depunerii icrelor, masculii urmăresc și lovesc cu capul femelele și astfel se produce fecundarea icrelor atunci când sunt expulzate. Icrele, care sunt transparente și nelipicioase, cad la fund unde pot fi mâncate de părinți. Depunerea icrelor este influențată de lumină. Dacă lumina dimineții este corespunzătoare, peștele depune icrele de obicei în primele ore din zori.

O femelă poate să producă loturi de câteva sute de icre săptămânal.

### CONDIȚII PENTRU PEȘTII PĂRINȚI, REPRODUCERE ȘI PRIMELE STADII DE VIAȚĂ

Se selectează un număr potrivit de pești sănătoși care se păstrează în apă corespunzătoare (de exemplu apendicele 4) cu cel puțin două săptămâni înainte de data preconizată pentru depunerea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fie lăsat să se reproducă cel puțin o dată înainte producerii lotului de icre utilizate în test. Densitatea peștelui în perioada respectivă nu trebuie să depășească 1 gram de pește per litru. Schimbările regulate de apă sau utilizarea sistemelor de purificare permit o densitate mai mare. Temperatura din acvarii se menține la  $25 \pm 2$  °C. Peștelui trebuie să i se asigure o alimentație variată, care poate să conțină, de exemplu hrana uscată specifică comercializată, Arthemias, chironomide, dafnia vii proaspăt ieșiți din ou, viermi albi (Enchytraeide).

În continuare, sunt prezentate două procedee, prin care s-a obținut în practică un lot suficient de icre fecundate, sănătoase pentru efectuarea unui test:

- (i) 8 femele și 16 masculi se introduc într-un acvariu cu 50 litri apă de diluție, ecranat de lumina directă și se lasă cât se poate de liniștiți timp de 48 ore. La fundul vasului se așează o tavă pentru depunerea icrelor în după-amiaza zilei de dinaintea inițierii testului. Tava pentru depunerea icrelor este alcătuită dintr-un cadru (plexiglas sau alt material potrivit) înalt de 5-7 cm, prevăzut cu o plasă cu ochiuri mari, de 2-5 mm, fixată la partea superioară și o plasă fină, cu ochiuri de 10-30 μm, la partea inferioară. La plasele cu ochiuri mari ale cadrului, se atașează un număr de „pomi pentru depunerea icrelor” dintr-o frânghie de nylon nerăsucită. După ce peștii au fost lăsați în întuneric timp de 12 ore, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. La 2-4 ore după depunerea icrelor, se scoate tava pentru depunerea icrelor și se colectează icrele. Cu tava pentru depunerea icrelor se evită mâncarea icrelor de către pești și se facilitează colectarea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fi depus icre cel puțin o dată înainte depunerii din care se iau icre pentru efectuarea testului.

**▼B**

- (ii) Un număr de 5-10 masculi și femele se adăpostesc individual cu cel puțin două săptămâni înaintea depunerii icrelor. După 5-10 zile, abdomenele femelelor se umflă și papila genitală a acestora devine vizibilă. Masculii nu au papilă. Depunerea icrelor se realizează în acvarii de depunere a icrelor prevăzute cu un fund fals din plasă (cum s-a descris anterior). Acvariul este umplut cu apă de diluție, astfel încât, deasupra plasei apa să fie de 5-10 cm. O femelă și doi masculi se introduc în acvariu cu o zi înaintea datei preconizate pentru depunerea icrelor. Temperatura apei se crește treptat la o valoare cu un grad mai mare decât temperatura de acclimatizare. Se stinge lumina și acvariul se lasă cât se poate de liniștit. Dimineață, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. După 2-4 ore, peștele se scoate și se colectează icrele. Dacă sunt necesare loturi mai mari de icre decât se pot obține de la o femelă, se pot instala, în paralel, mai multe acvarii de depunere a icrelor. Prin înregistrarea rezultatului fiecărei femele înaintea testului (dimensiunea lotului și calitatea), se selectează pentru reproducere femelele cu cele mai bune rezultate la reproducere.

Este necesar ca icrele să fie transferate în vasele pentru efectuarea testului cu ajutorul unor tuburi de sticlă (diametrul interior de minimum 4 mm) prevăzute cu un bulb de aspirație flexibil. Cantitatea de apă care se transferă odată cu icrele trebuie să fie cât mai mică posibilă. Icrele sunt mai grele decât apa și ies pe la fundul tubului. Trebuie avut grijă pentru a preveni ca icrele (și larvele) să vină în contact cu aerul. Proba (probele) din lot(uri) se examinează la microscop pentru a se asigura că nu există anomalii în primele etape de dezvoltare a embrionului. Nu este permisă dezinfecția icrelor.

Rata mortalității icrelor atinge apogeul în primele 24 de ore după fecundare. În această perioadă, se întâlnește adesea o mortalitate de 5-40 %. Icrele degenerază ca urmare a unei fecundări nereușite sau a dezvoltării insuficiente a embrionului. Calitatea lotului de icre se pare că depinde de peștele femelă, deoarece unele femele produc în mod constant icre de bună calitate, iar altele niciodată. De asemenea, rata de dezvoltare a embrionului și rata de ieșire din ou variază de la un lot la altul. Icrele fecundate cu succes și larvele din sacul vitelin supraviețuiesc bine, în mod normal peste 90 %. La 25 °C, ieșirea din ou se produce la 3-5 zile de la fertilizare și sacul vitelin se absoarbe în aproximativ 13 zile după fecundare.

Hisaoka și Battle au descris bine dezvoltarea embrionului (2). Datorită transparenței icrelor și larvelor după ieșirea din ou, se poate urmări dezvoltarea peștelui și este posibilă observarea malformațiilor. La aproximativ patru ore după depunerea icrelor, icrele nefecundate se pot distinge de cele fecundate (3). Pentru a efectua această examinare, icrele și larvele se așează pe vase de laborator de volum mic și se studiază la microscop.

Condițiile de desfășurare a testului, care se aplică în primele etape de viață, sunt prezentate în lista din apendicele 2. Valorile optime ale pH-ului și durtății apei de diluție sunt 7,8 și, respectiv, 250 mg CaCO<sub>3</sub>/l.

#### CALCULE ȘI STATISTICĂ

Se propune un procedeu în două etape. Mai întâi, se analizează statistic datele privind mortalitatea, dezvoltarea anormală și momentul ieșirii din ou. Apoi, pentru acele concentrații la care nu s-au observat efecte negative asupra oricăruia din parametrii menționați, se evaluează statistic lungimea corpului. Această abordare este recomandabilă deoarece toxicul poate să ucidă selectiv peștii mai mici, să întârzie momentul ieșirii din ou și să inducă malformații majore, obținându-se astfel măsurători viciate ale lungimii. În plus, pentru fiecare tratament, va exista același număr de pești ce urmează să se măsoare, asigurându-se validitatea statisticii testului.

**▼B****DETERMINAREA CL<sub>50</sub> ȘI CE<sub>50</sub>**

Se calculează procentul de icre și larve supraviețuitoare și se corectează cu mortalitatea din probele martor conform formulei lui Abbott (4):

$$P = 100 - \left( \frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

unde:

P = supraviețuirea corectată, %

P' = supraviețuirea observată la concentrațiile experimentate, %

C = supraviețuirea în cazul martorului, %

Dacă este posibil, CL<sub>50</sub> se determină printr-o metodă corespunzătoare la sfârșitul testului.

Dacă se dorește introducerea anomaliilor morfologice în statistica CE<sub>50</sub>, se poate folosi lucrarea lui Stephan (5) pentru orientare.

**ESTIMAREA CME0 ȘI CFEO**

Un obiectiv al testului efectuat pe icre și alevini este compararea concentrațiilor non-zero cu proba martor, adică determinarea CME0. Pentru aceasta se utilizează multiple procedee de comparare (6) (7) (8) (9) (10).

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 121-173.
2. Hisaoka K. K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, p. 311.
3. Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrafisch (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173-181.
4. Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333.
5. Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, p. 69-81.
6. Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.
7. Dunnett C. W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.
8. Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103-117.
9. Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531.
10. Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.



## CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

| Specia   | Temperatura (°C)                               | Salinitatea (0/00) | Perioada de expunere la lumină (ore) | Durata etapelor (zile) |        | Durata normală a testului   | Supraviețuirea matorului (minimum %) |                     |
|--|--|--------------------|--------------------------------------|------------------------|--------|---|--------------------------------------|---------------------|
|  |  |                    |                                      | Embrion                | Alevin |   | Reușita ieșirii din ou               | După ieșirea din ou |
| <i>Brachydanio rerio</i><br>Pește-lezebră      | 25 ± 1   | —                  | 12-16                                | 3-5                    | 8-10   | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (8-10 zile)      | 80                                   | 90                  |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i><br>Păstrăv-curcubeu | 10 ± 1 <sup>(1)</sup><br>12 ± 1 <sup>(2)</sup> | —                  | 0 <sup>(a)</sup>                     | 30-35                  | 25-30  | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 20 de zile după ieșirea din ou (50-55 zile) | 66                                   | 70                  |
| <i>Cyprinus carpio</i><br>Crap                 | 21-25  | —                  | 12-16                                | 5                      | > 4    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)       | 80                                   | 75                  |
| <i>Oryzias latipes</i><br>Medaka               | 24 ± 1 <sup>(1)</sup><br>23 ± 1 <sup>(2)</sup> | —                  | 12-16                                | 8-11                   | 4-8    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (13-16 zile)     | 80                                   | 80                  |
| <i>Pimephales promelas</i>                     | 25 ± 2   | —                  | 16                                   | 4-5                    | 5      | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)       | 60                                   | 70                  |

<sup>(1)</sup> Pentru embrioni.<sup>(2)</sup> Pentru larve.<sup>(a)</sup> Întineric pentru embrioni și larve până la o săptămână după ieșirea din ou, cu excepția cazului în care se inspectează. Apoi se dă o lumină atenuată pe durata testului.

## Apendicele 3

## Condițiile, durata testului și criteriile de supraviețuire pentru alte specii bine studiate

| Specii                                  | Temperatura (°C) | Salinitatea (0/00) | Perioada de expunere la lumină (ore) | Durata etapelor (zile) |        | Durata normală a testului  | Supraviețuirea matorului (minimum %) |                     |
|---|------------------|--------------------|--------------------------------------|------------------------|--------|--|--------------------------------------|---------------------|
|   |                  |                    |                                      | Embrion                | Alevin |  | Reușita ieșirii din ou               | După ieșirea din ou |
| APĂ DULCE                               |                  |                    |                                      |                        |        |  |                                      |                     |
| <i>Carassius auratus</i><br>Caras auriu | 24 ± 1           | —                  | —                                    | 3-4                    | > 4    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (7 zile)        | —                                    | 80                  |
| <i>Leopomis macrochirus</i>             | 21 ± 1           | —                  | 16                                   | 3                      | > 4    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 de zile după ieșirea din ou (7 zile)     | —                                    | 75                  |
| APĂ SĂRATĂ                              |                  |                    |                                      |                        |        |  |                                      |                     |
| <i>Menidia peninsulae</i>               | 22-25            | 15-22              | 12                                   | 1,5                    | 10     | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (6-7 zile)      | 80                                   | 60                  |
| <i>Clupea harengus</i><br>Hering        | 10 ± 1           | 8-15               | 12                                   | 20-25                  | 3-5    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (23-27 de zile) | 60                                   | 80                  |
| <i>Gadus morhua</i><br>Cod              | 5 ± 1            | 5-30               | 12                                   | 14-16                  | 3-5    | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (18 zile)       | 60                                   | 80                  |
| <i>Cyprinodon variegatus</i>            | 25 ± 1           | 15-30              | 12                                   | —                      | —      | De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4/7 zile după ieșirea din ou (28 de zile)  | > 75                                 | 80                  |

*Apendicele 4***CÂTEVA CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUȚIE  
ADMISE**

| SUBSTANȚA   | CONCENTRAȚIILE |
|---|----------------|
| Substanță impurificatoare   | < 20 mg/l      |
| Carbon organic total  | < 2 mg/l       |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l       |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l      |
| Totalul pesticidelor organofosforoase                             | < 50 ng/l      |
| Totalul pesticidelor organoclorice și a bifenililor policlorurați | < 50 ng/l      |
| Clorul organic total  | < 25 ng/l      |



## C.16. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ

### 1. METODĂ

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 213 (1998) a OCDE.

#### 1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității orale acute a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, ar putea fi necesară determinarea toxicității orale acute la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate orală acută se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv trebuie utilizate pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semi-teren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

#### 1.2. DEFINIȚII

**Toxicitatea orală acută:** reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore (h) de la administrarea orală unei doze unice de substanță testată.

**Doza:** reprezintă cantitatea de substanță testată consumată. Doza se exprimă ca masa ( $\mu\text{g}$ ) de substanță testată per animal experimental ( $\mu\text{g}/\text{albină}$ ). Nu se poate calcula doza reală pentru fiecare albină, deoarece albinele sunt hrănite în colectiv, dar se poate estima o doză medie (substanța testată consumată în total/numărul de albine experimentale dintr-o cușcă).

**DL<sub>50</sub> (doza letală medie) orală:** este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează pe cale orală. Valoarea DL<sub>50</sub> se exprimă în ( $\mu\text{g}$ ) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

**Mortalitatea:** un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

#### 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dispersată în soluție de zaharoză. Albinele primesc apoi aceeași hrană, fără substanța testată. Mortalitatea se înregistrează zilnic timp de cel puțin 48 h și se compară cu valorile pentru proba martor. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore, în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică  $\leq 10\%$ , este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL<sub>50</sub> la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

**▼B****1.4. VALIDITATEA TESTULUI**

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;
- $DL_{50}$  a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

**1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.5.1. Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere din același roi, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile de testare până în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progenituri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor” (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

**1.5.2. Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza orice material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de  $25 \pm 2$  °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500 g/l (50 % g/v). După administrarea dozelor de testare, hrana se furnizează *ad libitum*. Este necesar ca sistemul de alimentare să permită înregistrarea hranei consumate în fiecare cușcă (1.6.3.1). Se poate utiliza o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

**1.5.3. Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se repartizează în mod aleatoriu în cuștile experimentale, care se aranjează în mod aleatoriu în camera experimentală.

**▼B**

Albinele se pot înfometa timp de până la 2 ore înaintea începerii testului. Se recomandă ca albinele să fie lipsite de hrană înaintea tratamentului, astfel încât, la începutul testului, intestinalele tuturor albinelor să aibă același conținut. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

#### 1.5.4. Pregătirea dozelor

Dacă substanța testată este un compus miscibil cu apa, se poate dispersa direct în soluția de zaharoză 50 %. Pentru produsele și substanțele tehnice cu solubilitate mică în apă, se pot utiliza purtători care pot să fie solvenți organici, emulgatori sau agenți de dispersie cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu acetone, dime-tilformamidă, dimetilsulfoxid). Concentrația purtătorului depinde de solubilitatea substanței testate și ar trebui să fie aceeași pentru toate concentrațiile experimentate ale substanței. Cu toate acestea, în general, este potrivită o concentrație a purtătorului de 1 % care nu trebuie să fie depășită.

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței testate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: o soluție în apă și o soluție de zaharoză cu solventul/purtătorul la concentrația utilizată în soluțiile de dozare.

### 1.6. DESFĂȘURAREA TESTULUI

#### 1.6.1. Grupele experimentale și cele martor

Numărul de doze și probe identice trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea  $DL_{50}$  cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru  $DL_{50}$ . Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza în funcție de mortalitate) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată. În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Sunt prevăzute serii martor și pentru solvenții/purtătorii utilizați (1.5.4).

#### 1.6.2. Etalonul de toxicitate

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale  $DL_{50}$ . Pentru fiecare doză testată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dime-toatul, pentru care  $DL_{50}$  – 24 h semnalată se situează între valorile 0,10-0,35  $\mu\text{g}$  s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu, parationul).

**▼B****1.6.3. Expunerea****1.6.3.1. Administrarea dozelor**

Fiecărei grupe de albine i se administrează 100-200 µl soluție apoasă 50 % de zaharoză, ce conține substanța testată la concentrația corespunzătoare. Pentru produsele cu solubilitate mică, toxicitate mică sau concentrație mică în preparat este necesar un volum mare, deoarece trebuie să se utilizeze proporții mai mari din soluția de zaharoză. Se monitorizează cantitatea de hrană tratată consumată per grupă. După consumarea hranei (de obicei în 3-4 h), vasul de alimentare se scoate din cușcă și se înlocuiește cu unul care conține numai soluție de zaharoză. Soluțiile de zaharoză se furnizează apoi *ad libitum*. Pentru unii compuși, la concentrații mai mari, respingerea dozei testate poate să genereze un consum mic sau inexistent de hrană. După maximum 6 h, hrana tratată neconsumată se înlocuiește numai cu soluția de zaharoză. Se evaluează cantitatea de hrană tratată consumată (de exemplu prin măsurarea raportului volum/greutate pentru hrana tratată neconsumată).

**1.6.3.2. Durata**

Durata testului este de preferință de 48 ore după ce soluția de substanță testată este înlocuită cu soluția de zaharoză singură. Dacă mortalitatea continuă să crească cu mai mult de 10 % după primele 24 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

**1.6.4. Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după începerea testului și apoi la 24 h și 48 h (adică după administrarea dozei). Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se estimează cantitatea de hrană consumată per grupă. Compararea cantităților consumate din hrana tratată și netratată în 6 ore de administrare poate furniza date referitoare la gustul plăcut al hranei tratate.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

**1.6.5. Testul la valori-limită**

În unele cazuri (de exemplu când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori-limită, utilizând 100 µg s.a./albină pentru a demonstra că  $DL_{50}$  este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți, evaluarea cantității de hrană consumată și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă apar mortalități, se efectuează un studiu complet. Dacă se observă efecte subletale (1.6.4), se consemnează.

**▼B****2. DATE ȘI RAPORT****2.1. DATE**

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată și se calculează pantele curbilor și dozele letale medii ( $DL_{50}$ ) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5). Dacă hrana tratată nu se consumă în întregime, se determină doza de substanță testată per grupă.  $DL_{50}$  se exprimă în  $\mu\text{g}$  de substanță testată per albină.

**2.2. RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

**2.2.1. Substanța testată:**

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu stabilitatea în apă, presiunea vaporilor);
- datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) activ(e)].

**2.2.2. Speciile experimentale:**

- denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării;
- datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile etc.

**2.2.3. Condiții de testare:**

- temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală;
- condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor;
- metodele de preparare a soluțiilor mamă și experimentate (se specifică solventul și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (trebuie să se specifice agentul de solubilizare și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);
- protocolul testului, de exemplu numărul de încercări și concentrațiile experimentate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice și numărul de albine per cușcă;
- data efectuării testului.



**▼B****2.2.4. Rezultatele**

- rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;
- datele brute: mortalitatea la fiecare doză experimentată și fiecare moment de observare;
- trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;
- valorile  $DL_{50}$  cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;
- metodele statistice utilizate pentru determinarea  $DL_{50}$ ;
- mortalitatea la martori;
- alte efecte biologice observate sau măsurate, de exemplu comportamentul anormal al albinelor (inclusiv respingerea dozei cu substanța testată), rata consumului de hrană la grupele tratate și netratate;
- orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

**3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March 1993.
2. Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, p. 119-125.
3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.
4. Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
5. Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, p. 265-267.

**▼B****C.17. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PRIN CONTACT****1. METODĂ**

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 214 (1998) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității acute prin contact a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, s-ar putea să fie necesară determinarea toxicității acute de contact la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate acută prin contact se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv se utilizează pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semi-teren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

**1.2. DEFINIȚII**

**Toxicitatea orală acută:** reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore de la aplicarea locală a unei doze unice dintr-o substanță.

**Doza:** reprezintă cantitatea de substanță testată aplicată. Doza se exprimă ca masa ( $\mu\text{g}$ ) de substanță testată per animal experimental ( $\mu\text{g}/\text{albină}$ ).

**DL<sub>50</sub> (doza letală medie) de contact:** este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează prin contact. Valoarea DL<sub>50</sub> se exprimă în ( $\mu\text{g}$ ) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

**Mortalitatea:** un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

**1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dizolvată într-un purtător corespunzător, prin aplicare directă pe torace (picături). Durata testului este de 48 h. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică  $\leq 10\%$ , este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Mortalitatea se înregistrează zilnic și se compară cu valorile martorului. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL<sub>50</sub> la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

**▼B****1.4. VALIDITATEA TESTULUI**

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;
- $DL_{50}$  a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

**1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.5.1. Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană, din același roi etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile de testare până în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progeneruri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor” (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

**1.5.2. Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza un material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de  $25 \pm 2$  °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile, se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500 g/l (50 % g/v) și se furnizează *ad libitum* pe durata testului, într-un vas de alimentare. Acesta poate să fie o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

**1.5.3. Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se anesteziază cu bioxid de carbon sau azot pentru aplicarea substanței testate. Cantitatea de anestezic utilizat și durata expunerii trebuie să fie minime. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

**1.5.4. Pregătirea dozelor**

Substanța testată urmează să se aplice sub formă de soluție într-un purtător, adică un solvent organic sau o soluție apoasă cu un agent de umectare. Ca solvent organic, se preferă acetona, dar se pot utiliza și alți solvenți organici cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu dimetilformamidă, dimetilsulfoxid). Pentru preparatele dispersate în apă și substanțele organice cu polaritate mare, care nu sunt solubile în solvenții organici purtători, soluțiile se pot aplica mai ușor, dacă se prepară într-o soluție slabă de agent de umectare comercializat (de exemplu Agral, Cettowett, Lubrol, Triton, Tween).

**▼B**

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței testate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: una tratată cu apă și una tratată cu solvent/agent de dispersie.

## 1.6. PROCEDURĂ

1.6.1. **Grupele experimentale și cele martor**

Numărul de doze și probe identice experimentate trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea  $DL_{50}$  cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru  $DL_{50}$ . Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza în funcție de mortalitate) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată.

În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Dacă se utilizează un solvent organic sau un agent de umectare, trebuie să se includă trei serii martor suplimentare, de câte 10 albine fiecare.

1.6.2. **Etalonul de toxicitate**

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale  $DL_{50}$ . Pentru fiecare doză experimentată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dimetoatul, pentru care  $DL_{50}$  – 24 h prin contact semnalată se situează între valorile 0,10-0,35  $\mu\text{g}$  s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu parationul).

1.6.3. **Expunerea**1.6.3.1. *Administrarea dozelor*

Albinele anesteziate se tratează individual prin aplicare locală. Albinele se distribuie în mod aleatoriu pentru diferite doze experimentate și diferiți martori. Se aplică un volum de 1  $\mu\text{l}$  soluție de substanță testată în concentrații potrivite cu o micropipetă pe partea dorsală a toracelui fiecărei albine. Dacă este necesar, se pot utiliza alte volume. După aplicare, albinele sunt repartizate în cuști și li se administrează soluții de zaharoză.

1.6.3.2. *Durata*

Durata testului este de preferință de 48 ore. Dacă mortalitatea crește cu mai mult de 10 % între 24 h și 48 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

**▼B****1.6.4. Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după administrarea dozelor și apoi la 24 h și 48 h. Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

**1.6.5. Testul la valori-limită**

În unele cazuri (de exemplu când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori-limită, utilizând 100  $\mu$ g s.a./albină pentru a demonstra că  $DL_{50}$  este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă se observă efecte subletale (a se vedea 1.6.4), se consemnează.

**2. DATE ȘI RAPORT****2.1. DATE**

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată (adică la 24 h, 48 h și, dacă este relevant, 72 h, 96 h) și se calculează pantele curbilor și dozele letale medii ( $DL_{50}$ ) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5).  $DL_{50}$  se exprimă în  $\mu$ g de substanță testată per albină.

**2.2. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

**2.2.1. Substanța testată:**

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu stabilitatea în apă, presiunea de vapori);
- datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) active].

**2.2.2. Speciile experimentale:**

- denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării;
- datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile etc.

**▼B****2.2.3. Condiții de testare:**

- temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală;
- condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor;
- metodele de administrare a substanței testate, de exemplu solventul purtător utilizat, volumul soluției de substanță testată aplicat, anestezicele utilizate;
- protocolul testului, de exemplu numărul de încercări și concentrațiile testate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice, și numărul de albine per cușcă;
- data efectuării testului.

**2.2.4. Rezultatele:**

- rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;
- datele brute: mortalitatea la fiecare concentrație experimentată și fiecare moment de observare;
- trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;
- valorile  $DL_{50}$  cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;
- metodele statistice utilizate pentru determinarea  $DL_{50}$ ;
- mortalitatea la martori;
- alte efecte biologice observate sau măsurate și orice răspunsuri anormale ale albinelor;
- orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

**3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March, 1993.
2. Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, p. 119-125.
3. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.
4. Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
5. Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, p. 265-267.



## C.18. ADSORBȚIA/DESORBȚIA PRINTR-O METODĂ DE STABILIRE A ECHILIBRULUI PROBELOR

### 1. METODĂ

Prezenta metodă reproduce Orientarea 106 a OCDE pentru determinarea adsorbției/desorbției printr-o metodă de stabilire a echilibrului probelor (2000).

#### 1.1. INTRODUCERE

Metoda ia în considerare un test de intercalibrare și un schimb de experiență în vederea selecției solului pentru realizarea unei încercări de adsorbție (1) (2) (3) (4) și, de asemenea, liniile directoare existente la nivel național (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Studiile de adsorbție/desorbție sunt utile pentru obținerea de date esențiale privind mobilitatea substanțelor chimice și distribuția acestora în compartimentele solului, apei și aerului din biosferă (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Datele se pot utiliza pentru a prognoza sau estima, de exemplu, predispoziția unei substanțe chimice pentru degradare (22) (23), transformare sau asimilare de organisme (24); extracție prin spălare în profilul solului (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilitate din sol (21) (29) (30); scurgere de pe suprafața terenurilor în apele naturale (18) (31) (32). Rezultatele adsorbției se pot utiliza pentru comparare și modelare (19) (33) (34) (35).

Distribuția unei substanțe chimice între fazele solului și cea apoasă este un proces complex care depinde de o serie de factori diferiți: natura chimică a substanței (12) (36) (37) (38) (39) (40), caracteristicile solului (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), factorii climatici cum sunt precipitațiile atmosferice, temperatura, lumina soarelui și vântul. Astfel, numeroasele fenomene și mecanisme implicate în procesul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol nu se pot explica în întregime printr-un model simplificat de laborator, cum este prezenta metodă. Cu toate acestea, chiar dacă o experiență de acest fel nu poate să cuprindă toate cazurile posibile din mediu, poate furniza date valoroase privind relația dintre mediul înconjurător și adsorbția unei substanțe chimice.

A se vedea și introducerea generală.

#### 1.2. DOMENIUL DE APLICARE

Metoda are ca obiect determinarea comportamentului de adsorbție/desorbție al unei substanțe pe diferite soluri. Scopul este obținerea unei valori a sorbției care să se poată utiliza la prognoza repartiției în condiții de mediu diferite; în acest scop, se determină coeficienții de adsorbție la echilibru pentru o substanță chimică pe diferite soluri în funcție de caracteristicile solului (de exemplu, conținutul de carbon organic, conținutul de argilă și structura și pH-ul solului). Trebuie să se utilizeze tipuri diferite de soluri pentru a cuprinde cât mai multe interacțiuni posibile ale unei anumite substanțe cu solurile existente în natură.

În prezenta metodă, adsorbția reprezintă procesul de legare a unei substanțe chimice la suprafețele solurilor; nu se poate face deosebire între diferitele procese de adsorbție (adsorbția fizică și chimică) și procese ca degradarea catalizată a suprafeței, adsorbția în grosime sau reacția chimică. Adsorbția care apare pe particulele coloidale (diametrul < 0,2 μm) generate de soluri nu se ia în considerare.

**▼B**

Parametrii solurilor considerați cei mai importanți pentru adsorbție sunt: conținutul de carbon organic (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); conținutul de argilă și structura solului (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) și valoarea pH-ului pentru compușii ionizabili (3) (4) (42). Alți parametri ai solurilor care pot să aibă un impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe sunt: capacitatea efectivă de schimb de cationi (CESC), conținutul de oxizi de fier și aluminiu amorf, în special pentru solurile vulcanice și tropicale (4), precum și suprafața specifică (49).

Testarea este destinată evaluării adsorbției unei substanțe chimice pe diferite tipuri de soluri cu valori diferite ale conținutului de carbon organic, ale conținutului de argilă și ale structurii solului și ale pH-ului. Aceasta conține trei etape:

**Etapă 1:** Studiu preliminar pentru determinarea:

- raportului sol/soluție;
- timpului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru;
- adsorbției substanței testate pe suprafața vaselor experimentale și stabilității substanței testate în timpul încercării.

**Etapă 2:** Proba de identificare: se studiază adsorbția pe cinci tipuri diferite de soluri cu ajutorul cineticii adsorbției la o singură concentrație și se determină coeficienții de distribuție  $K_d$  și  $K_{co}$ .

**Etapă 3:** Determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru stabilirea influenței concentrației asupra gradului de adsorbție pe soluri.

Studiul desorbției cu ajutorul cineticii de desorbție/izotermele de desorbție Freundlich (apendicele 1).

### 1.3. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

| Simbol                  | Definiție   | Unități       |
|-------------------------|---|---------------|
| $A_{t_i}$               | adsorbția la momentul $t_i$   | %             |
| $A_{ec}$                | adsorbția la stabilirea echilibrului de adsorbție                             | %             |
| $m_s^{ads}(t_i)$        | masa substanței testate adsorbite pe sol la momentul $t_i$                    | $\mu\text{g}$ |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | masa substanței testate adsorbite pe sol în intervalul de timp $\Delta t_i$   | $\mu\text{g}$ |
| $m_s^{ads}(ec)$         | masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție           | $\mu\text{g}$ |
| $m_0$                   | masa substanței testate din eprubetă, la începutul analizei de adsorbție      | $\mu\text{g}$ |
| $m_m^{ads}(t_i)$        | masa substanței testate măsurate într-un alicot ( $v_a^A$ ) la momentul $t_i$ | $\mu\text{g}$ |
| $m_{ap}^{ads}(ec)$      | masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție                 | $\mu\text{g}$ |
| $m_{sol}$               | cantitatea fazei de sol, exprimată în substanță uscată a solului              | g             |



## ▼ B

| Simbol                  | Definiție  | Unități   |
|-------------------------|--|---|
| $C_{sm}$                | concentrația masică a soluției mamă de substanță   | $\mu\text{g cm}^{-3}$                                   |
| $C_0$                   | concentrația masică inițială a soluției testate în contact cu solul  | $\mu\text{g cm}^{-3}$                                   |
| $C_{ap}^{ads}(t_i)$     | concentrația masică a substanței în fază apoasă la momentul $t_i$ de efectuare a încercării                  | $\mu\text{g cm}^{-3}$                                   |
| $C_s^{ads}(ec)$         | conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție  | $\mu\text{g g}^{-1}$                                    |
| $C_{ap}^{ads}(ec)$      | concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție                                   | $\mu\text{g cm}^{-3}$                                   |
| $V_0$                   | volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul în timpul încercării de adsorbție                        | $\text{cm}^3$   |
| $v_a^A$                 | volumul alicotului în care se măsoară substanța testată  | $\text{cm}^3$   |
| $K_d$                   | coeficientul de distribuție pentru adsorbție   | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$                             |
| $K_{co}$                | coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic   | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$                             |
| $K_{so}$                | coeficientul de distribuție normalizată a substanței organice  | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$                             |
| $K_F^{ads}$             | coeficientul de adsorbție Freundlich   | $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$ |
| $1/n$                   | exponentul Freundlich  |   |
| $D_{t_i}$               | desorbția la momentul $t_i$  | %   |
| $D_{\Delta t_i}$        | desorbția corespunzătoare unui interval de timp $\Delta t_i$   | %   |
| $K_{des}$               | coeficientul de desorbție aparentă   | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$                             |
| $K_F^{des}$             | coeficientul de desorbție Freundlich   | $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$ |
| $m_{ap}^{des}(t_i)$     | masa substanței testate desorbite din sol la momentul $t_i$  | $\mu\text{g}$   |
| $m_m^{des}(\Delta t_i)$ | masa substanței testate desorbite din sol în intervalul de timp $\Delta t_i$                                 | $\mu\text{g}$   |
| $m_m^{des}(ec)$         | masa substanței, determinată analitic în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție                 | $\mu\text{g}$   |
| $m_{ap}^{des}(ec)$      | masa totală a substanței testate desorbite la stabilirea echilibrului de desorbție                           | $\mu\text{g}$   |
| $m_s^{des}(\Delta t_i)$ | masa substanței adsorbită în continuare pe sol după intervalul de timp $\Delta t_i$                          | $\mu\text{g}$   |
| $m_{ap}^A$              | masa substanței rămase de la stabilirea echilibrului de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului | $\mu\text{g}$   |
| $C_s^{des}(ec)$         | conținutul de substanță testată adsorbită în continuare pe sol la stabilirea echilibrului de desorbție       | $\mu\text{g g}^{-1}$                                    |

## ▼ B

| Simbol             | Definiție  | Unități               |
|--------------------|--|-----------------------|
| $C_{ap}^{des}(ec)$ | concentrația masică a substanței testate în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție  | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| $V_T$              | volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie                                     | $\text{cm}^3$         |
| $V_R$              | volumul supernatantului scos din eprubetă după stabilirea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum dintr-o soluție 0,01 M de $\text{CaCl}_2$ | $\text{cm}^3$         |
| $V_a^D$            | volumul unui alicot din care s-au luat probe pentru analiză la momentul (i), în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie          | $\text{cm}^3$         |
| $V_{na}^iD$        | volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru determinarea substanței testate, în experimentarea cineticii de desorbție prin metoda paralelă              | $\text{cm}^3$         |
| $V_r^F$            | volumul soluției luate din eprubetă pentru determinarea substanței testate, la stabilirea echilibrului de desorbție  | $\text{cm}^3$         |
| BM                 | bilanțul masic   | %                     |
| $m_E$              | masa totală a substanței testate extrase din sol și pereții vasului experimental în două etape   | $\mu\text{g}$         |
| $V_{rec}$          | volumul supernatantului recuperat după stabilirea echilibrului de adsorbție  | $\text{cm}^3$         |
| $P_{ow}$           | coeficientul de partiție octanol/apă   |                       |
| pKa                | constantă de disociere   |                       |
| $S_a$              | solubilitatea apei   | $\text{g l}^{-1}$     |

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se adaugă volume cunoscute de soluții ale substanței testate, nemarcate sau marcate radioactiv, în concentrații cunoscute în  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, la probele de sol cu un conținut de substanță uscată cunoscut, care au fost aduse în prealabil la echilibru în  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. Se agită amestecul un timp corespunzător. Suspensiile de sol se separă apoi prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare și se analizează faza apoasă. Se calculează cantitatea de substanță testată adsorbită pe proba de sol prin diferența dintre cantitatea de substanță testată prezentă inițial în soluție și cantitatea rămasă la sfârșitul experimentării (metoda indirectă).

Ca alternativă, cantitatea de substanță testată adsorbită se mai poate determina direct prin analiza solului (metoda directă). Această metodă, care include extracția treptată a solului cu un solvent potrivit, se recomandă în cazurile în care concentrația diferită în soluție a substanței nu se poate determina cu precizie. Exemple de asemenea cazuri sunt: adsorbția substanței testate pe suprafața vaselor experimentale, instabilitatea substanței testate pe durata experimentării, adsorbția slabă care generează doar modificări mici ale concentrației în soluție și adsorbția puternică care generează concentrații mici care nu se pot determina cu precizie. Dacă se utilizează o substanță marcată radioactiv, se poate evita extracția solului prin analiza fazei de sol prin calcinare și numărătoarea în scintilație lichidă. Cu toate acestea, numărătoarea în scintilație lichidă este un procedeu nespecific care nu poate să facă diferența dintre produsele de bază și cele de transformare; prin urmare, se utilizează numai în situația în care substanța chimică testată este stabilă pe durata studiului.

**▼B****1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ**

Reactivii chimici trebuie să fie de tip analitic. Se recomandă utilizarea substanțelor de testare nemarcate cu o compoziție cunoscută și, de preferat, cu o puritate de minimum 95 % sau a substanțelor de testare marcate radioactiv cu o compoziție și puritate cunoscute. La indicatorii cu perioada de înjumătățire scurtă se aplică corecții de dezin-tegrare.

Înainte de realizarea unei încercări de adsorbție/desorbție, trebuie să fie cunoscute datele referitoare de substanța testată, prezentate în continuare:

- (a) solubilitatea în apă (A.6);
- (b) presiunea de vapori (A.4) și constanta legii lui Henry;
- (c) degradarea abiotică: hidroliza în funcție de pH (C.7);
- (d) coeficientul de partiție (A.8);
- (e) biodegradabilitatea imediată (C.4) sau transformarea aerobică și anaerobică în sol;
- (f) pKa pentru substanțele ionizabile;
- (g) fotoliza directă în apă (adică spectrul de absorbție UV-vizibil în apă, randamentul cuantic) și fotodegradarea pe sol.

**1.6. APLICABILITATEA TESTULUI**

Testarea se poate aplica substanțelor chimice pentru care este disponibilă o metodă analitică suficient de precisă. Un parametru important care influențează credibilitatea rezultatelor, în special atunci când se utilizează metoda indirectă, este stabilitatea substanței testate în scara de timp a probei. Prin urmare, este necesară verificarea stabilității într-un studiu preliminar; dacă, în scara de timp a încercării, se observă o modificare, se recomandă ca studiul principal să se realizeze prin analizarea atât a solului, cât și a fazelor apoase.

În realizarea prezentei încercări, pot să apară dificultăți pentru substanțele cu solubilitate mică în apă ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ), precum și pentru substanțele cu sarcini mari, deoarece concentrația în faza apoasă nu se poate măsura analitic cu suficientă precizie. În situațiile de acest fel, trebuie să se ia măsuri suplimentare. Modalitatea de rezolvare a acestor probleme se indică, orientativ, la punctele respective ale prezentei metode.

La testarea substanțelor volatile, trebuie să se aibă grijă să se evite pierderile în timpul studiului.

**1.7. DESCRIEREA METODEI****1.7.1. Aparatura și reactivii chimici**

Aparatură standard de laborator, în special cea prezentată în continuare:

- (a) Eprubete sau vase pentru realizarea experimentelor. Este important ca eprubetele și vasele respective:
  - să fie instalate direct în centrifugă pentru a minimiza erorile de manipulare și transfer;
  - să fie obținute dintr-un material inert, care minimizează adsorbția substanței testate pe suprafața acestora.

**▼B**

- (b) Agitator: agitator acționat de sus sau un dispozitiv echivalent; agitatorul menține solul în suspensie în timpul agitării.
- (c) Centrifugă: de preferință una de viteză mare, de exemplu forțele de centrifugare  $> 3\,000\text{ g}$ , termoreglabilă, care să poată să separe particulele cu diametrul mai mare de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  din soluția apoasă. Recipientele trebuie să fie închise în timpul agitării și centrifugării pentru a evita volatilizarea și pierderile de apă; pentru a minimiza adsorbția pe acestea, se recomandă utilizarea capacelor dezactivate, cum ar fi capacele cu filet căptușite cu teflon.
- (d) Opțional: dispozitiv de filtrare; filtre cu o porozitate de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ , sterile, de unică folosință. Trebuie să se acorde o atenție deosebită la alegerea materialului pentru filtru, pentru a evita pierderile de substanță testată pe acesta; pentru substanțele testate cu solubilitate mică, nu se recomandă un material de filtrare organic.
- (e) Instrumente analitice, potrivite pentru măsurarea concentrației substanței testate.
- (f) Etuvă de laborator care permite menținerea unei temperaturi de  $103\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**1.7.2. Caracterizarea și selectarea solurilor**

Solurile se caracterizează prin trei parametri de care se consideră că depinde în mare măsură capacitatea adsorbantă: carbonul organic, conținutul de argilă și structura solului și pH-ul. După cum s-a menționat deja (a se vedea Domeniul de aplicare), și alte proprietăți fizico-chimice ale solului pot să aibă impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe și aceste cazuri trebuie avute în vedere.

Metodele utilizate pentru caracterizarea solului sunt foarte importante și pot avea o influență semnificativă asupra rezultatelor. Prin urmare, se recomandă ca pH-ul solului să se măsoare într-o soluție de  $\text{CaCl}_2$   $0,01\text{ M}$  (adică soluția utilizată în testarea de adsorbție/desorbție) conform metodei ISO corespunzătoare (ISO-10390-1). Se mai recomandă determinarea altor proprietăți relevante ale solului conform metodelor standard (de exemplu „Îndreptarul pentru analiza solului” ISO); acest lucru permite ca analiza datelor privind sorbția să se facă pe baza parametrilor solului standardizați la nivel mondial. O orientare pentru metodele standard existente pentru analiza și caracterizarea solului este oferită în bibliografie (50-52). Pentru etalonarea metodelor de analiză a solului, se recomandă utilizarea solurilor de referință.

O orientare privind selecția solurilor pentru încercările de adsorbție/desorbție se prezintă în tabelul 1. Cele șapte soluri selectate cuprind tipurile de soluri întâlnite în zonele geografice temperate. Pentru substanțele testate ionizabile, solurile selectate trebuie să cuprindă un domeniu larg de pH, pentru a fi posibilă evaluarea adsorbției substanței în formele ionizată și neionizată ale acesteia. O orientare privind modul de utilizare a mai multor soluri diferite în diferite etape ale încercării se prezintă la punctul 1.9 Realizarea încercării.

Dacă se preferă alte tipuri de soluri, este necesar ca parametrii și variația proprietăților acestora să fie similare cu cele descrise în tabelul 1, chiar dacă nu satisfac criteriile cu exactitate.



Tabelul 1

**Orientare pentru selectarea probelor de soluri pentru adsorbție-desorbție**

| Tipul solului | Valorile pH-ului (în CaCl <sub>2</sub> 0,01 M) | Conținutul de carbon organic ( % )        | Conținutul de argilă ( % ) | Structura solului <sup>(1)</sup>  |
|---------------|--|---|----------------------------|-----------------------------------|
| 1             | 4,5 - 5,5                                      | 1,0 - 2,0                                 | 65-80                      | argilă                            |
| 2             | > 7,5  | 3,5 - 5,0                                 | 20-40                      | pământ argilos-nisipos            |
| 3             | 5,5 - 7,0                                      | 1,5 - 3,0                                 | 15-25                      | argilă nisipoasă din aluviuni     |
| 4             | 4,0 - 5,5                                      | 3,0 - 4,0                                 | 15-30                      | argilă nisipoasă                  |
| 5             | < 4,0 - 6,0 <sup>(2)</sup>                     | < 0,5 - 1,5 <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup> | < 10-15 <sup>(2)</sup>     | nisip argilos                     |
| 6             | > 7,0  | < 0,5 - 1,0 <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup> | 40-65                      | pământ argilos-nisipos/<br>argilă |
| 7             | < 4,5  | > 10                                      | < 10                       | nisip/nisip argilos               |

<sup>(1)</sup> Conform FAO și sistemului SUA (85).

<sup>(2)</sup> Este de preferat ca parametrii respectivi să prezinte valori în domeniul dat. Dacă, totuși, apar dificultăți în găsirea unui sol corespunzător, se acceptă valorile mai mici decât minimum indicat.

<sup>(3)</sup> Solurile cu un conținut de carbon organic mai mic de 3 % pot schimba corelația dintre conținutul de substanțe organice și adsorbție. Astfel, se recomandă utilizarea solurilor cu un conținut minimum de carbon organic de 0,3 %.

### 1.7.3. Colectarea și depozitarea probelor de sol

#### 1.7.3.1. Colectarea

Nu se recomandă tehnici de prelevare a probelor sau instrumente specifice; tehnica de prelevare a probelor depinde de scopul studiului (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Se au în vedere cele menționate în continuare:

(a) este necesară o descriere detaliată a situației terenului; aceasta include poziția, acoperirea cu vegetație, tratamentul cu pesticide și îngrășăminte, adaosuri biologice sau contaminarea accidentală. Este necesar să se respecte recomandările standardelor ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la descrierea locului de prelevare a probelor;

(b) locul de prelevare a probelor trebuie să fie stabilit cu ajutorul UTM (proiecția Mercator transversală universală/cota convențională europeană) sau a coordonatelor geografice; astfel ar fi posibilă repetarea colectării unui anumit sol în viitor sau ar ajuta la încadrarea solului în diferite sisteme de clasificare utilizate în diferite țări. De asemenea, se recomandă să se colecteze sol numai din planul de referință A de până la 20 cm adâncime. În special pentru tipul de sol nr. 7, dacă există un plan de referință O<sub>h</sub> ca parte a solului, acesta se include în prelevarea probelor.

Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură care să garanteze păstrarea proprietăților inițiale ale solului, nealterate în mare parte.

**▼B****1.7.3.2. Depozitarea**

Se preferă utilizarea solurilor proaspăt colectate de pe teren. Numai dacă acest lucru nu este posibil, solul se poate păstra la temperatura ambiantă și în aer uscat. Nu se recomandă termene-limită, dar solurile depozitate mai mult de trei ani se analizează din nou înaintea utilizării pentru determinarea conținutului de carbon organic, pH-ului și CSC (capacitatea de schimb de cationi).

**1.7.3.3. Manipularea și pregătirea probelor de sol pentru testare**

Solurile se usucă în aer la temperatura ambiantă (de preferință la 20-25 °C). Dezagregarea se realizează cu o forță minimă, astfel încât structura originală a solului să se modifice cât se poate de puțin. Solurile se cern până la dimensiuni ale particulelor  $\leq 2$  mm; se respectă recomandările standardului ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la cernere. Se recomandă omogenizarea atentă, deoarece aceasta crește reproductibilitatea rezultatelor. Conținutul de umiditate din fiecare sol se determină pe trei alicot și încălzire la 105 °C până la greutate constantă (aproximativ 12 ore). În toate calculele, pentru masa de sol se consideră masa uscată în etuvă, adică greutatea solului la care se aplică corecția pentru conținutul de umiditate.

**1.7.4. Pregătirea substanței testate pentru aplicarea pe sol**

Substanța testată se dizolvă într-o soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M în apă distilată sau apă deionizată; soluția de  $\text{CaCl}_2$  se utilizează sub formă de fază apoasă de solvent pentru îmbunătățirea centrifugării și minimizarea schimbului de cationi. Concentrația soluției mamă este, de preferință, mai mare cu trei ordine de mărime decât limita de detecție a metodei analitice utilizate. Pragul menționat asigură măsurători precise pentru metodologia urmată în prezenta metodă; în afară de aceasta, concentrația soluției mamă trebuie să fie mai mică decât solubilitatea în apă a substanței testate.

Este de preferat ca soluția mamă să se prepare chiar înaintea aplicării pe probele de sol și să se păstreze închisă, la întuneric, la 4 °C. Durata depozitării depinde de stabilitatea substanței testate și de concentrația acesteia în soluție.

Numai pentru substanțele cu solubilitate mică ( $S_a < 10^{-4}$  g l<sup>-1</sup>), ar putea să fie necesar un agent de solubilizare corespunzător, dacă dizolvarea substanței testate este dificilă. Agentul de solubilizare respectiv: (a) trebuie să fie miscibil cu apa, de exemplu metanol sau acetonitril; (b) concentrația acestuia nu trebuie să fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției mamă și să reprezinte mai puțin decât cea din soluția substanței testate care va veni în contact cu solul (de preferință mai mică de 0,1 %); și (c) nu trebuie să fie un agent tensioactiv sau să intre în reacții solvolitice cu substanța chimică testată. Utilizarea unui agent de solubilizare se stipulează și se justifică în raportarea rezultatelor.

O altă posibilitate pentru substanțele cu solubilitate mică constă în adăugarea substanței testate în sistemul experimental prin îmbogățire: substanța de testat se dizolvă într-un solvent organic, din care se ia un alicot care se adaugă în sistemul format din sol și soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M în apă distilată sau deionizată. Conținutul de solvent organic în faza apoasă se menține cât se poate de mic, de obicei mai mic sau egal cu 0,1 %. Se poate ca îmbogățirea dintr-o soluție organică să nu fie reproductibilă din punct de vedere al volumului. Astfel, se poate introduce încă o eroare, deoarece concentrația substanței testate și a cosolventului s-ar putea să nu fie aceleași în toate încercările.

**▼B****1.8. CONDIȚII NECESARE PENTRU REALIZAREA TESTULUI DE ADSORBȚIE/DESORBȚIE****1.8.1. Metoda analitică**

Parametrii importanți care pot să influențeze precizia măsurătorilor de sorbție includ acuratețea metodei analitice pentru analiza atât a fazei soluției, cât și a celei adsorbite, stabilitatea și puritatea substanței testate, realizarea echilibrului de sorpție, amplitudinea variației concentrației soluției, raportul sol/soluție și modificările din structura solului în timpul procesului de stabilire a echilibrului (35) (59)-(62). Câteva exemple privind problemele de acuratețe sunt prezentate în apendicele 2.

Trebuie să se verifice fiabilitatea metodei analitice pentru un domeniu de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Cercetătorul trebuie să aibă libertatea de a elabora o metodă potrivită care să prezinte acuratețe, precizie, reproductibilitate, limite de detecție și recuperare optime. În continuare, se oferă o orientare privind modul de efectuare a acestei încercări.

Un volum potrivit de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, de exemplu  $100 \text{ cm}^3$ , se supune agitării timp de 4 ore împreună cu o cantitate de sol, de exemplu 20 g, cu o capacitate mare de adsorbție, adică cu un conținut mare de carbon organic și argilă; greutatea și volumele menționate pot să varieze în funcție de necesitățile analitice, dar ca punct de plecare se preferă un raport sol/soluție de 1:5. Amestecul se supune centrifugării și faza apoasă se poate filtra. Se adaugă un volum determinat de soluție mamă a substanței testate la aceasta din urmă pentru a obține o concentrație nominală care să se încadreze în domeniul de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Volumul respectiv trebuie să fie mai mic sau egal cu 10 % din volumul final al fazei apoase, pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției la preechilibru. Se analizează soluția.

Pentru verificarea artefactelor din metoda analitică și a efectelor de matrice provocate de sol, trebuie să se includă o probă oarbă care să conțină sistemul sol + soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (fără substanța testată).

Metodele analitice care se pot utiliza pentru măsurători de sorbție includ cromatografia gaz-lichid (CGL), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), spectrometria (de exemplu GC/spectrometrie de masă, HPLC/spectrometrie de masă) și numărătoare în scintilație lichidă (pentru substanțele marcate radioactiv). Indiferent de metoda analitică utilizată, se consideră că este bine, dacă recuceririle se situează între 90 % și 110 % din valoarea nominală. Pentru a permite detectarea și evaluarea după ce a avut loc partiția, este necesar ca limitele de detecție ale metodei analitice să fie cu cel puțin două ordine de mărime mai mici decât concentrația nominală.

Caracteristicile și limitele de detecție ale metodei analitice disponibile pentru efectuarea studiilor de adsorbție joacă un rol important în stabilirea condițiilor de testare și în întreaga desfășurare a încercării. Metoda urmează o cale experimentală generală și oferă recomandări și orientare pentru alte soluții, dacă există posibilitatea impunerii unor restricții datorită metodei analitice și dotării laboratorului.

▼ **B**1.8.2. **Selectarea raporturilor optime sol/soluție**

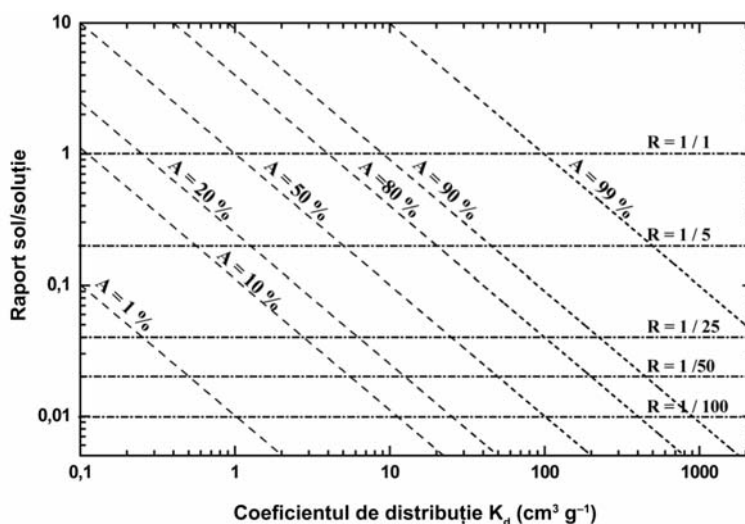
Selectarea raporturilor optime sol/soluție pentru studiile de sorbție depinde de coeficientul de distribuție  $K_d$  și de gradul relativ al adsorbției dorite. Modificarea concentrației substanței în soluție determină acuratețea statistică a măsurătorii, datorită formei ecuației pentru adsorbție și limitei de detecție a metodologiei analitice, în determinarea concentrației substanței chimice în soluție. Prin urmare, în practica generală, este util să se stabilească câteva raporturi fixe, pentru care procentul adsorbit să fie mai mare de 20 % și de preferință > 50 % (62), având grijă în același timp să se mențină o concentrație suficient de mare a substanței testate în fază apoasă, pentru a fi măsurată cu acuratețe. Acest lucru este deosebit de important pentru cantitățile mari, în procente, adsorbite.

Un procedeu comod de selectare a raporturilor optime sol/apă constă în estimarea valorii  $K_d$  fie prin studii preliminare, fie prin tehnici de estimare stabilite (apendicele 3). Apoi, selectarea unui raport optim se poate realiza cu ajutorul reprezentării grafice a raportului sol/soluție în funcție de  $K_d$  pentru procente stabilite ale adsorbției (figura 1). În reprezentarea grafică menționată, se consideră că ecuația de adsorbție este lineară<sup>(1)</sup>. Relația aplicabilă se obține printr-o ecuație de rearanjare (4) a  $K_d$  sub forma ecuației (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left( \frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{ec})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

sau sub forma sa logaritmică, considerând că  $R = m_{\text{sol}}/V_0$  și  $\frac{A_{\text{ec}}\%}{100} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{ec})}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[ \frac{A_{\text{ec}}\%/100}{1 - A_{\text{ec}}\%/100} \right] \quad (2)$$



**Figura 1** Relația dintre raporturile sol/soluție și  $K_d$  la diferite procente de substanță testată adsorbită

<sup>(1)</sup>  $C_s^{\text{ads}}(\text{ec}) = K_d \cdot C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$ .



## ▼B

Figura 1 prezintă raporturile sol/soluție în funcție de  $K_d$  pentru diferite valori ale adsorbției. De exemplu, pentru un raport sol/soluție de 1:5 și o valoare a  $K_d$  de 20, ar avea loc o adsorbție de 80 %. Pentru a obține o adsorbție de 50 % pentru aceeași valoare a  $K_d$ , trebuie să se utilizeze un raport de 1:25. Acest procedeu pentru selectarea raporturilor optime sol/soluție oferă persoanei care efectuează studiul flexibilitatea de a satisface necesitățile experimentale.

Zonele care sunt mai greu de rezolvat sunt cele în care substanța chimică este puternic sau foarte puțin adsorbită. Dacă se produce o adsorbție slabă, se recomandă un raport sol/soluție de 1:1, deși s-ar putea ca pentru unele tipuri de soluri foarte organice să fie necesare raporturi mai mici pentru a obține un măr. La metodologia analitică, trebuie să se acorde o atenție deosebită la măsurarea modificărilor mici ale concentrației soluției; în caz contrar, măsurarea adsorbției nu va fi exactă. Pe de altă parte, la valori foarte mari ale coeficienților de distribuție  $K_d$ , se poate merge până la un raport sol/soluție de 1:100 pentru a lăsa o cantitate importantă de substanță chimică în soluție. Cu toate acestea, trebuie mare grijă pentru asigurarea unei amestecări bune și sistemul trebuie lăsat un timp suficient pentru stabilirea echilibrului. Un alt procedeu utilizat pentru rezolvarea cazurilor extreme de acest tip, atunci când nu există o metodologie analitică specifică, constă în estimarea valorii  $K_d$  cu ajutorul unor procedee de estimare, de exemplu, cu ajutorul valorilor  $P_{ow}$  (apendicele 3). Acesta ar putea să fie util, în special pentru substanțele chimice puțin adsorbite/polare, cu  $P_{ow} < 20$  și pentru substanțele chimice lipofile/care se adsorb puternic, cu  $P_{ow} > 10^4$ .

## 1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI

### 1.9.1. Condiții de testare

Toate testele se realizează la temperatura ambiantă și, dacă este posibil, la o temperatură constantă între 20 °C și 25 °C.

Condițiile de centrifugare trebuie să permită eliminarea particulelor mai mari de 0,2 μm din soluție. Valoarea menționată activează particulele de cele mai mici dimensiuni care sunt considerate particule solide și reprezintă limita dintre particulele solide și coloidale. O orientare asupra modului de determinare a condițiilor de centrifugare se prezintă în apendicele 4.

Dacă dispozitivele de centrifugare nu pot să garanteze eliminarea particulelor mai mari de 0,2 μm, se poate utiliza o combinație de centrifugare cu filtrare, cu filtre de 0,2 μm. Filtrele de acest tip ar trebui realizate dintr-un material inert potrivit pentru a evita pierderile de substanță testată pe acestea. În orice caz, trebuie dovedit că nu se produc pierderi de substanță testată în timpul filtrării.

### 1.9.2. Etapa 1 – Studiu preliminar

Scopul realizării unui studiu preliminar a fost deja prezentat la punctul „Domeniu de aplicare”. O orientare privind inițierea unei încercări de acest tip se prezintă în experimentul propus în continuare.

#### 1.9.2.1. Selectarea raporturilor optime sol/soluție

Se utilizează două tipuri de soluri și trei raporturi sol/soluție (șase probe). Un tip de sol are conținut mare de carbon organic și conținut mic de argilă și celălalt are conținut mic de carbon organic și conținut mare de argilă. Se propun următoarele raporturi sol/soluție:

— 50 g sol și 50 cm<sup>3</sup> soluție apoasă de substanță testată (raport 1/1);

**▼B**

— 10 g sol și 50 cm<sup>3</sup> soluție apoasă de substanță testată (raport 1/5);

— 2 g sol și 50 cm<sup>3</sup> soluție apoasă de substanță testată (raport 1/25).

Cantitatea minimă de sol pe care se poate efectua testarea depinde de dotările din laborator și de performanța metodelor analitice utilizate. Cu toate acestea, se recomandă să se utilizeze cel puțin 1 g și, de preferință, 2 g, pentru a obține rezultate credibile în urma încercărilor.

O probă martor care conține numai substanța testată în soluție de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (fără sol) se supune unor etape precis identice cu cele ale sistemelor studiate, pentru a verifica stabilitatea substanței testate în soluție de CaCl<sub>2</sub> și posibilitatea adsorbției acesteia pe suprafețele vaselor experimentale.

O probă oarbă pentru fiecare sol, care conține aceeași cantitate de sol și un volum total de 50 cm<sup>3</sup> de soluție de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (fără substanța testată) se supune aceluiași procedeu de testare. Acesta reprezintă principalul control în timpul analizei pentru detectarea substanțelor care interferează sau a solurilor contaminate.

Toate încercările, inclusiv cele cu probă martor și probă oarbă, se realizează cel puțin de două ori. Numărul total de probe care trebuie pregătite pentru studiu se poate calcula ținând seama de metodologia care va fi urmată.

Metodele pentru studiul preliminar și studiul principal sunt, în general, aceleași, excepțiile fiind menționate, dacă este cazul.

Probele de sol uscate în aer se aduc la echilibru prin agitare cu un volum minim de 45 cm<sup>3</sup> de soluție de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M peste noapte (12 h) înaintea zilei în care se efectuează testarea. Apoi, se adaugă un volum determinat din soluția mamă a substanței testate pentru a aduce volumul final la 50 cm<sup>3</sup>. Volumul respectiv de soluție mamă adăugat: (a) nu trebuie să fie mai mare de 10 % din volumul final de 50 cm<sup>3</sup> de fază apoasă pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției de prestabilire a echilibrului; (b) trebuie să dea, de preferință, o concentrație inițială a substanței testate în contact cu solul ( $C_0$ ) cu cel puțin două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice; pragul menționat asigură posibilitatea de a efectua măsurători exacte chiar și atunci când se produc adsorbții puternice (> 90 %) și de determinare a izotermelor de adsorbție. Se recomandă, dacă este posibil, ca și concentrația inițială a substanței ( $C_0$ ) să nu fie mai mare decât jumătate din limita de solubilitate a acesteia.

În continuare se prezintă un exemplu de mod de calcul al concentrației soluției mamă ( $C_{sm}$ ). Se consideră o limită de detecție de 0,01 μg cm<sup>-3</sup> și o adsorbție de 90 %; astfel, concentrația inițială a substanței testate în contact cu solul este, de preferință, de 1 μg cm<sup>-3</sup> (cu două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție). Considerând că se adaugă volum maxim recomandat de soluție mamă, adică 5-45 cm<sup>3</sup> soluție de echilibrare de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (= 10 % din soluția mamă până la 50 cm<sup>3</sup> volumul total al fazei apoase), concentrația soluției mamă este de 10 μg cm<sup>-3</sup>; aceasta este cu trei ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice.

Se măsoară valoarea pH-ului fazei apoase înainte și după contactul cu solul, deoarece joacă un rol important în întregul proces de adsorbție, în special pentru substanțele ionizabile.

## ▼B

Amestecul se agită până la stabilirea echilibrului de adsorbție. Momentul stabilirii echilibrului în sol variază în mare măsură, în funcție de substanța chimică și de sol; în general, este suficient un timp de 24 h (77). În studiul preliminar, probele se pot colecta la anumite intervale de timp din cele 48 de ore de amestecare (de exemplu la 4, 8, 24, 48 h). Cu toate acestea, momentele în care se fac determinările se stabilesc și în funcție de programul de lucru al laboratorului.

Există două opțiuni pentru analiza substanței testate în soluție apoasă: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Trebuie să se sublinieze că, deși metoda paralelă este mai incomodă din punct de vedere experimental, tratarea matematică a rezultatelor este mai simplă (apendicele 5). Cu toate acestea, alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să ia în considerare dotarea și resursele de care dispune laboratorul.

- (a) Metoda paralelă: se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu intervalele de timp la care se dorește să se studieze cinetica adsorbției. După centrifugare și dacă se dorește filtrarea, se recuperează faza apoasă din prima eprubetă cât se poate de complet și se măsoară după, de exemplu, 4 h, cea din a doua eprubetă după 8 h, cea din a treia după 24 h etc.
- (b) Metoda în serie: se prepară doar o probă dublă pentru fiecare raport sol/soluție. La intervale determinate de timp, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot din faza apoasă pentru determinarea substanței testate; apoi testarea continuă cu amestecul inițial. Dacă se aplică filtrarea după centrifugare, laboratorul trebuie să dispună de dispozitivele pentru realizarea filtrării unor mici alicoti din soluția apoasă. Se recomandă ca volumul total al alicotilor luați să nu fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției, pentru nu a modifica semnificativ raportul sol/soluție și pentru a reduce masa substanței dizolvate care poate să fie adsorbită în timpul încercării.

Se calculează adsorbția  $A_t$ , în procente, la fiecare moment ( $t_i$ ) în funcție de concentrația inițială nominală și concentrația măsurată în momentul prelevării probei ( $t_i$ ), se corectează cu valoarea probei oarbe. Se reprezintă grafic  $A_t$  în funcție de timp (apendicele 5 figura 1) pentru a estima stabilirea palierului de echilibru<sup>(1)</sup>. Se mai calculează valoarea  $K_d$  la echilibru. În funcție de această valoare  $K_d$ , se selectează raporturile optime sol/soluție din figura 1, astfel încât adsorbția în procente să ajungă la mai mult de 20 % și, de preferință, la > 50 % (61). Toate ecuațiile și principiile aplicabile se prezintă la punctul „Rezultatele și raportarea acestora” și în appendicele 5.

#### 1.9.2.2. *Determinarea momentului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru*

După cum s-a menționat deja, reprezentările grafice ale  $A_t$  sau  $C_{aq}^{ads}$  în funcție de timp permit estimarea stabilirii echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru. Figurile 1 și 2 din appendicele 5 prezintă exemple de asemenea reprezentări grafice. Momentul de stabilire a echilibrului reprezintă nevoia sistemului de a ajunge la un palier.

<sup>(1)</sup> Reprezentările grafice ale concentrației substanței de testat în fază apoasă ( $C_{ap}^{ads}$ ) în funcție de timp s-ar mai putea utiliza la estimarea atingerii palierului de echilibru (apendicele 5 figura 2).

## ▼B

Dacă, pentru un anumit sol, nu se găsește un palier, ci o creștere constantă, acest lucru se poate datora unor factori care complică situația, cum ar fi biodegradarea sau difuzia lentă. Biodegradarea se poate pune în evidență prin repetarea încercării cu o probă sterilizată de sol. Dacă nici în acest caz nu se obține un palier, cercetătorul trebuie să caute alte fenomene care ar putea să fie implicate în studiile sale specifice; acest lucru se poate realiza prin modificări corespunzătoare ale condițiilor experimentale (temperatură, timpi de agitare, raporturi sol/soluție). Rămâne la latitudinea cercetătorului să decidă dacă să continue procedeul de testare, în ciuda unui posibil eșec în stabilirea echilibrului.

#### 1.9.2.3. *Adsorbția pe suprafața vasului experimental și stabilitatea substanței testate*

Se pot obține date privind adsorbția substanței testate pe suprafața vaselor experimentale, precum și stabilitatea acesteia, prin analizarea probelor martor. Dacă se observă o epuizare mai mare decât eroarea standard a metodei analitice, se poate să fie implicată degradarea abiotică și adsorbția pe suprafața vasului experimental. Se poate face distincția dintre aceste două fenomene prin spălarea cu grijă a pereților vasului experimental cu un volum cunoscut dintr-un solvent potrivit și analizarea soluției de spălare pentru determinarea substanței testate. Dacă nu se observă adsorbție pe suprafața vaselor experimentale, epuizarea indică instabilitatea abiotică a substanței testate. Dacă se găsește adsorbție, este necesar ca vasul experimental să fie din alt material. Cu toate acestea, rezultatele încercării descrise anterior privind adsorbția pe suprafața vaselor experimentale nu pot fi extrapolate direct la testarea sol/soluție. Prezența solului va afecta adsorbția respectivă.

Se pot obține date suplimentare privind stabilitatea substanței testate prin determinarea bilanțului de masă original în timp. Aceasta înseamnă că se analizează faza apoasă, extractele de sol și pereții vaselor experimentale pentru determinarea substanței testate. Diferența dintre masa substanței chimice testate adăugate și suma maselor substanței chimice testate în faza apoasă, extractele de sol și de pe pereții vaselor experimentale este egală cu masa degradată și volatilizată și neextrasă. Pentru a determina bilanțul de masă, este necesar ca echilibrul de adsorbție să fi fost stabilit în timpul experimentării.

Bilanțul de masă se face pe ambele soluri și pentru un raport sol/soluție per sol care dă o epuizare de peste 20 % și, de preferință, > 50 % la echilibru. La terminarea încercării pentru găsirea raportului prin analiza ultimei probe de fază apoasă după 48 ore, fazele se separă prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare. Faza apoasă se recuperează atât cât este posibil și se adaugă solului un solvent de extracție potrivit (coeficientul de extracție de cel puțin 95 %) pentru extragerea substanței testate. Se recomandă cel puțin două extracții succesive. Se determină cantitatea de substanță din extractele din sol și de pe pereții vaselor experimentale și se calculează bilanțul de masă (*Date și raport*, ecuația 10). Dacă acesta este mai mic de 90 %, se consideră că substanța testată este instabilă pe scara timpului de testare. Cu toate acestea, studiile se mai pot continua, ținând seama de instabilitatea substanței testate; în cazul respectiv, se recomandă analizarea ambelor faze în studiul principal.

## ▼B

1.9.2.4. *Etapă 2 – Cinetica de adsorbție la o concentrație a substanței testate*

Se utilizează cinci soluri, selectate din tabelul 1. Este avantajoasă includerea unora sau a tuturor solurilor utilizate în studiul preliminar, dacă este cazul, printre cele cinci soluri. În cazul respectiv, pentru solurile utilizate în studiul preliminar, etapa 2 nu trebuie să se repete.

Momentul stabilirii echilibrului, raportul sol/soluție, greutatea probei de sol, volumul fazei apoase în contact cu solul și concentrația substanței testate în soluție se aleg în funcție de rezultatele studiului preliminar. Determinarea se face de preferință după aproximativ 2, 4, 6, 8 (posibil și 10) și 24 h timp de contact; timpul de agitare se poate prelungi la maximum 48 h, dacă o substanță chimică necesită un timp mai îndelungat pentru stabilirea echilibrului în privința rezultatelor încercării pentru găsirea raportului. Cu toate acestea, momentele de efectuare a determinărilor se pot stabili cu încredere.

Fiecare testare (un sol și o soluție) se realizează cel puțin dublu pentru a permite estimarea variației rezultatelor. Pentru fiecare testare se pregătește o probă oarbă. Aceasta conține solul și soluția de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. O probă martor care conține numai substanța testată în soluția de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (fără sol) se supune aceluiași procedeu de testare, servind drept garanție pentru situații neprevăzute.

Se calculează adsorbția în procente la fiecare moment  $A_t$  și interval de timp  $\Delta t_i$  (după necesități) și se reprezintă grafic în funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de distribuție  $K_d$  la echilibru, precum și coeficientul de adsorbție normalizat cu carbon organic  $K_{co}$  (pentru substanțele chimice organice nepolare).

#### Rezultatele determinării cineticii de adsorbție

Valoarea  $K_d$  linear este în general exactă pentru descrierea comportamentului de sorbție în sol (35) (78) și reprezintă o expresie a mobilității inerente a substanțelor chimice în sol. De exemplu, se consideră, în general, că substanțele chimice cu  $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  sunt mobile calitativ. În mod similar, MacCall *et al.* (16) au elaborat un sistem de clasificare a mobilității în funcție de valorile  $K_{co}$ . În afară de acesta, există sisteme de clasificare a extracției prin spălare în funcție de relația dintre  $K_{co}$  și TD-50<sup>(1)</sup> (32) (79).

De asemenea, conform studiilor de analiză a erorii (61), valorile  $K_d$  mai mici de  $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  nu se pot determina cu exactitate dintr-o scădere a concentrației în fază apoasă, chiar și atunci când se utilizează raportul sol/soluție cel mai favorabil (din punct de vedere al exactității), adică 1:1. Într-un asemenea caz, se recomandă analiza ambelor faze, sol și soluție.

<sup>(1)</sup> TD-50: timpul de degradare pentru 50 % din substanța testată.

## ▼B

Referitor la observațiile anterioare, se recomandă ca studiul privind comportamentul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol și posibila mobilitate a acesteia să fie continuat prin determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru sistemele respective, pentru care este posibilă o determinare exactă a  $K_d$  după protocolul de testare din prezenta metodă de testare. Este posibilă o determinare exactă, dacă valoarea care rezultă prin amplificarea  $K_d$  cu raportul sol/soluție este  $> 0,3$ , când măsurătorile au la bază scăderea concentrației în faza apoasă (metoda indirectă) sau  $> 0,1$ , când se analizează ambele faze (metoda directă) (61).

#### 1.9.2.5. *Etapa 3 – Izotermele de adsorbție și cinetica de desorbție/izotermele de desorbție*

##### 1.9.2.5.1. Izotermele de adsorbție

Se utilizează cinci concentrații ale substanței testate, care cuprind de preferință două ordine de mărime; în alegerea concentrațiilor respective, se ține seama de solubilitatea în apă și de concentrațiile în soluție apoasă rezultate la echilibru. Pe toată durata studiului se menține același raport sol/soluție. Testarea de adsorbție se realizează așa cum s-a descris anterior, cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată la timpul necesar pentru stabilirea echilibrului, cum s-a determinat mai înainte în etapa 2. Se determină concentrațiile la echilibru în soluție și se calculează cantitatea adsorbită din epuizarea substanței testate în soluție sau prin metoda directă. Se reprezintă grafic masa adsorbită per unitatea de masă de sol în funcție de concentrația la echilibru a substanței testate (a se vedea *Date și raport*).

Rezultatele determinării izotermelor de adsorbție

Printre modelele matematice pentru adsorbție propuse până în prezent, izoterma lui Freundlich este una utilizată frecvent pentru descrierea procesului de adsorbție. Date mai detaliate privind interpretarea și importanța modelelor de adsorbție se prezintă în bibliografie (41) (45) (80) (81) (82).

*Notă:* Trebuie să se menționeze că este posibilă o comparare a valorilor  $K_F$  (coeficientul de adsorbție Freundlich) pentru diferite substanțe, dacă valorile  $K_F$  respective se exprimă în aceleași unități (83).

##### 1.9.2.5.2. Cinetica de desorbție

Scopul prezentei încercări este de a cerceta dacă o substanță chimică este adsorbită reversibil sau ireversibil pe un sol. Aceste date sunt importante, deoarece procesul de desorbție joacă un rol important și în comportamentul unei substanțe chimice în solul din teren. În plus, datele de desorbție sunt date de intrare importante în modelarea pe calculator a simulărilor pentru extracția prin spălarea și scurgerea substanțelor dizolvate. Dacă se dorește un studiu de desorbție, se recomandă să se efectueze studiul descris în continuare pentru fiecare sistem pentru care a fost posibilă o determinare exactă a  $K_d$  în testarea precedentă pentru determinarea cineticii de adsorbție.

Ca și în cazul studiului cineticii de adsorbție, există două opțiuni pentru continuarea încercării pentru determinarea cineticii de desorbție: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să țină seama de dotarea și resursele laboratorului.

## ▼B

- (a) Metoda paralelă: pentru fiecare sol care se alege pentru continuarea studiului de desorbție, se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu numărul intervalelor de timp la care se dorește să se studieze cinetica de desorbție. Este preferabil să se utilizeze aceleași intervale de timp ca în testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție; totuși, timpul total se poate prelungi, dacă este cazul, pentru ca în sistem să se stabilească echilibrul de desorbție. Pentru orice testare (un sol, o soluție) se pregătește o probă oarbă. Aceasta conține solul și soluția de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. Ca probă martor, substanța testată în soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (fără sol) se supune aceleași proceduri de testare. Toate amestecurile de sol cu soluție se agită până se stabilește echilibrul de adsorbție (după cum s-a stabilit anterior în etapa 2). Apoi, fazele se separă prin centrifugare și se îndepărtează fazele apoase cât se poate de mult. Volumul soluției îndepărtate se înlocuiește cu un volum egal de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, fără substanța testată și noile amestecuri se agită din nou. Faza apoasă din prima eprubetă se recuperează cât se poate de mult și se măsoară după, de exemplu, 2 h, cea din a doua eprubetă după 4 h, cea din a treia după 6 h etc., până când se realizează echilibrul de desorbție.
- (b) Metoda în serie: după testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție, amestecul este supus centrifugării și se elimină faza apoasă cât se poate de mult. Volumul de soluție îndepărtat se înlocuiește cu un volum egal de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, fără substanța testată. Noul amestec se agită până când se stabilește echilibrul de desorbție. În acest timp, la intervale egale, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot de fază apoasă pentru determinarea substanței testate; apoi, testarea continuă cu amestecul original. Volumul fiecărui alicot trebuie să fie mai mic de 1 % din volumul total. Se adaugă aceeași cantitate de soluție proaspătă de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M la amestec pentru a menține raportul sol/soluție și se continuă agitarea până la următorul interval de timp.

Se calculează desorbția, în procente, la fiecare moment ( $D_t$ ) și interval de timp ( $D_{\Delta t}$ ) (în funcție de necesitățile studiului) și se reprezintă grafic în funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de desorbție  $K_{des}$  la echilibru. Toate ecuațiile aplicabile sunt date la punctul „Date și raport” și în apendicele 5.

#### Rezultatele încercării pentru determinarea cineticii de desorbție

Reprezentările grafice obișnuite ale desorbției  $D_t$  și adsorbției  $A_t$ , în procente, în funcție de timp, permit determinarea reversibilității procesului de adsorbție. Dacă echilibrul de desorbție se atinge chiar într-un timp dublu față de timpul necesar pentru atingerea echilibrului de adsorbție și desorbția totală este mai mare decât 75 % din cantitatea adsorbită, se consideră că adsorbția este reversibilă.

#### 1.9.2.5.3. Izotermele de desorbție

Se determină izotermele de desorbție Freundlich pe solurile utilizate în testarea pentru izotermele de adsorbție. Testarea de desorbție se efectuează conform descrierii de la punctul „Cinetica de desorbție”, cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată, la echilibrul de desorbție. Se calculează cantitatea de substanță testată desorbită. Se reprezintă grafic conținutul de substanță testată, care rămâne adsorbită pe sol la atingerea echilibrului de desorbție, în funcție de concentrația la echilibru a substanței testate în soluție (a se vedea *Date și raport* și apendicele 5).

**▼ B****2. DATE ȘI RAPORT**

Rezultatele analitice se prezintă sub formă de tabel (a se vedea apendicele 6). Se prezintă măsurătorile individuale și mediile calculate. Se prezintă reprezentările grafice ale izotermelor de adsorbție. Calculele se fac conform metodologiei descrise în continuare.

În sensul prezentei încercări, se consideră că greutatea pentru 1 cm<sup>3</sup> de soluție apoasă este 1 g. Raportul sol/soluție se poate exprima în unități de greutate/greutate sau greutate/volum cu aceeași cifră.

**2.1. ADSORPȚIA**

Adsorbția ( $A_{t_i}$ ) se definește ca fiind cantitatea de substanță, în procente, adsorbită pe sol raportată la cantitatea prezentă la începutul încercării, în condițiile de testare. Dacă substanța testată este stabilă și nu se adsorbe într-o măsură importantă pe pereții vasului experimental, se calculează  $A_{t_i}$  pentru fiecare moment  $t_i$ , conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

unde:

$A_{t_i}$  = adsorbția la momentul  $t_i$  ( % )

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = masa substanței testate adsorbite pe sol la momentul  $t_i$  (μg)

$m_0$  = masa substanței testate din eprubetă, la începutul încercării (μg).

Date detaliate privind modul de calcul al adsorbției  $A_{t_i}$ , în procente, pentru metodele paralelă și în serie se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de distribuție  $K_d$  este raportul dintre conținutul de substanță din faza de sol și concentrația masică de substanță în soluția apoasă, în condițiile de testare, când se stabilește echilibrul de adsorbție.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{ec})}{C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{ec})}{m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{sol}}} \quad (4)$$

unde

$C_s^{\text{ads}}(\text{ec})$  = conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție (μg g<sup>-1</sup>);

$C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție (μg cm<sup>-3</sup>). Concentrația respectivă se determină analitic ținând seama de valorile date de probele oarbe

$m_s^{\text{ads}}(\text{ec})$  = masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg)

$m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

$m_{\text{sol}}$  = cantitatea de fază de sol, exprimată în masă uscată de sol (g)

$V_0$  = volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul (cm<sup>3</sup>).

Relația dintre  $A_{\text{ec}}$  și  $K_d$  este dată de:

$$K_d = \frac{A_{\text{ec}}}{100 - A_{\text{ec}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{sol}}} \quad (5)$$



**▼B**

unde:

$A_{ec}$  = adsorbția la echilibru, %

Coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic  $K_{co}$  reprezintă relația dintre coeficientul de distribuție  $K_d$  și conținutul de carbon organic din proba de sol:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%CO} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (6)$$

unde:

% co = procentajul de carbon organic în proba de sol ( $\text{g g}^{-1}$ )

Coeficientul  $K_{co}$  reprezintă o valoare unică ce caracterizează partiția în principal a substanțelor chimice organice nepolare între carbonul organic din sol sau sediment și apă. Adsorbția substanțelor chimice respective este corelată cu conținutul organic al solidului adsorbant (7); astfel, valorile  $K_{co}$  depind de caracteristicile specifice ale fracțiilor humice care au o capacitate de sorbție foarte diferită, datorită diferențelor de origine, geneză etc.

#### 2.1.1. Izoterme de adsorbție

Ecuția izotermelor de adsorbție Freundlich reprezintă relația dintre cantitatea de substanță testată adsorbită și concentrația substanței testate în soluție la echilibru (ecuația 8).

Rezultatele sunt tratate ca la „Adsorbție” și, pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță testată adsorbită pe sol după testarea de adsorbție [ $C_s^{ads}(ec)$ , indicată în altă parte ca x/m]. Se consideră că echilibrul a fost stabilit și că  $C_s^{ads}(ec)$  reprezintă valoarea la echilibru:

$$C_s^{ads}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{sol}} = \frac{[C_0 - C_{ap}^{ads}(ec)] \cdot V_0}{m_{sol}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Ecuția de adsorbție Freundlich este prezentată la (8):

$$C_s^{ads}(ec) = K_F^{ads} \cdot C_{ap}^{ads}(ec)^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

sau sub formă lineară:

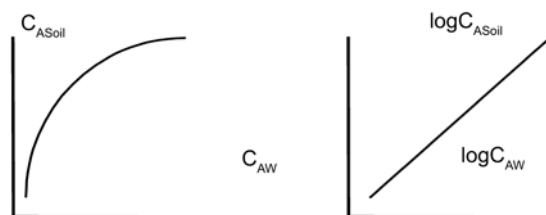
$$\log C_s^{ads}(ec) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{ads}(ec) \quad (9)$$

unde:

$K_F^{ads}$  = coeficientul de adsorbție Freundlich; se exprimă în  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , numai dacă  $1/n = 1$ ; în toate celelalte cazuri, panta  $1/n$  se introduce în dimensiunea  $K_F^{ads}$  [ $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$ ]

$n$  = constanta de regresie,  $1/n$  variază în general între 0,7-1,0, ceea ce indică faptul că rezultatele privind sorbția sunt în mod frecvent ușor nelineare.

Ecuțiile (8) și (9) sunt reprezentate grafic și se calculează valorile pentru  $K_F^{ads}$  și  $1/n$  prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 9. Se mai calculează coeficientul de corelare  $r^2$  al ecuației logaritmice. În figura 2 se prezintă un exemplu al acestor reprezentări grafice.

▼ B

**Figura 2** Reprezentarea grafică a ecuației Freundlich, normală și linearizată

### 2.1.2. Bilanțul de masă

Bilanțul de masă (BM) se definește ca procentul de substanță care se poate recupera analitic după o testare de adsorbție în funcție de cantitatea de substanță la începutul încercării.

Prelucrarea rezultatelor va fi diferită, dacă solventul este complet miscibil cu apa. În cazul solventului miscibil cu apa, se poate aplica prelucrarea datelor descrise la „Desorbție” pentru determinarea cantității de substanță recuperată prin extracția solventului. Dacă solventul este mai puțin miscibil cu apa, trebuie să se determine cantitatea recuperată.

Bilanțul de masă BM pentru adsorbție se calculează după cum urmează: se consideră că termenul ( $m_E$ ) corespunde sumei maselor substanței chimice testate extrase din sol și de pe suprafața vasului experimental cu un solvent organic:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{ap}^{ads}(ec) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

unde:

BM = bilanțul de masă ( % );

$m_E$  = masa totală a substanței testate extrase din sol și de pe pereții vasului experimental în două etape ( $\mu g$ );

$C_0$  = concentrația inițială în unități de masă a soluției experimentale în contact cu solul ( $\mu g \text{ cm}^{-3}$ );

$V_{rec}$  = volumul supernatantului recuperat după echilibrul de adsorbție ( $\text{cm}^{-3}$ ).

### 2.2. DESORBȚIA

Desorbția (D) se definește ca fiind cantitatea de substanță testată desorbită, exprimată în procente, corelată cu cantitatea de substanță adsorbită anterior, în condițiile de testare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

unde:

$D_{t_i}$  = desorbția la momentul  $t_i$  ( % );

**▼ B**

$m_{ap}^{des}(t_i)$  = masa substanței testate desorbite din sol la momentul  $t_i(\mu g)$ ;

$m_s^{ads}(ec)$  = masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție ( $\mu g$ ).

Informații detaliate privind modul de calcul a desorbției  $D_i$ , în procente, pentru metodele paralelă și în serie, se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de desorbție aparentă ( $K_{des}$ ) este, în condițiile de testare, raportul dintre conținutul de substanță ce rămâne în faza de sol și concentrația masică a substanței desorbite în soluție apoasă, când se realizează echilibrul de desorbție.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{ap}^{des}(ec)} \frac{V_T}{m_{sol}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

unde:

$K_{des}$  = coeficientul de desorbție ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )

$m_{ap}^{des}(ec)$  = masa totală a substanței testate desorbite din sol la echilibrul de desorbție ( $\mu g$ )

$V_T$  = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul determinării cineticii de desorbție ( $\text{cm}^3$ )

Modul de calculare a  $m_{ap}^{des}(ec)$  este prezentat în apendicele 5 la punctul „Desorbție”.

Observație:

Dacă testarea anterioară de adsorbție s-a realizat prin metoda paralelă, volumul  $V_T$  din ecuația 12 se consideră egal cu  $V_0$ .

### 2.2.1. Izotermele de desorbție

Ecuația pentru izotermele de desorbție Freundlich reprezintă corelația dintre conținutul de substanță testată care rămâne adsorbită pe sol și concentrația de substanță testată în soluție la echilibrul de desorbție (ecuația 16).

Pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție cu formula următoare:

$$C_s^{des}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{sol}} \text{ (}\mu\text{gg}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{ap}^{des}(ec)$  se definește prin relația:

$$m_{ap}^{des}(ec) = m_m^{des}(ec) \cdot \frac{V_0}{V_f} - m_{ap}^A(\mu g) \quad (14)$$

unde:

$C_s^{des}(ec)$  = conținutul de substanță testată ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție ( $\mu g \text{ g}^{-1}$ );

$m_m^{des}(ec)$  = masa substanței determinate analitic în fază apoasă la echilibrul de desorbție ( $\mu g$ );

**▼ B**

$m_{ap}^A$  = masa substanței testate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului ( $\mu\text{g}$ )

$m_{ap}^{des}(ec)$  = masa substanței din soluție la echilibrul de adsorbție ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{ap}^A = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_r^F$  = volumul de soluție luat din eprubetă pentru determinarea substanței testate, la echilibrul de desorbție ( $\text{cm}^3$ );

$V_R$  = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ ).

Ecuatia de desorbție Freundlich este prezentată în ecuația 16:

$$C_s^{des}(ec) = K_F^{des} \cdot C_{ap}^{des}(ec)^{1/n} \quad (\mu\text{gg}^{-1}) \quad (16)$$

sau în forma lineară:

$$\log C_s^{des}(ec) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{des}(ec) \quad (17)$$

unde:

$K_F^{des}$  = coeficientul de desorbție Freundlich;

$n$  = constanta de regresie;

$C_{ap}^{des}(ec)$  = concentrația masică de substanță în fază apoasă la echilibrul de desorbție ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

Ecuatiile 16 și 17 se pot reprezenta grafic și se calculează valorile pentru  $K_F^{des}$  și  $1/n$  prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 17.

Observație:

Dacă exponentul  $1/n$  al adsorbției sau desorbției Freundlich este egal cu 1, constantele de legătură ( $K_F^{ads}$  și  $K_F^{des}$ ) vor fi egale cu constantele de adsorbție sau desorbție la echilibru ( $K_d$  și respectiv  $K_{des}$ ) și reprezentările grafice ale  $C_s$  în funcție de  $C_{ap}$  vor fi lineare. Dacă exponenții nu sunt egali cu 1, reprezentările grafice ale  $C_s$  în funcție de  $C_{ap}$  vor fi nelineare și constantele de adsorbție și desorbție vor varia în lungul izotermelor.

### 2.2.2. Raportul de testare

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

- Identificarea completă a probelor de sol utilizate, care include:
- definirea geografică a locului (latitudine, longitudine);
- data prelevării probelor;

**▼B**

- destinația terenului (de exemplu sol agricol, forestier etc.);
- adâncimea prelevării probelor;
- conținutul de nisip/mâl/argilă;
- valorile pH-ului (în soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M);
- conținutul de carbon organic;
- conținutul de substanțe organice;
- conținutul de azot;
- raportul C/N;
- capacitatea de schimb de cationi (mmol/kg);
- toate datele referitoare la colectarea și depozitarea probelor de sol;
- dacă este cazul, toate datele relevante pentru interpretarea adsorbției/desorbției substanței testate;
- specificarea metodelor utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;
- date privind substanța testată, dacă este cazul;
- temperatura la care s-a efectuat testarea;
- condițiile de centrifugare;
- metoda analitică utilizată pentru determinarea substanței testate;
- justificarea oricărei utilizări a agentului de solubilizare pentru pregătirea soluției mamă a substanței testate;
- explicarea corecțiilor făcute în calcule, dacă este relevant;
- rezultatele conform formularului (apendicele 6) și prezentările grafice;
- toate datele și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor încercării.

### 3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.
2. Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

## ▼B

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils”, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena” in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, p. 83-122.
14. Hassett J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments” in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, p. 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media”. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), p. 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis”, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil”. Weeds, 13, p. 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils”. J. Agric. Food Chem., 18, p. 524-528.
19. Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil” in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides”, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, p. 901-932.

## ▼B

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils”. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil”. J. Sci. Fd Agric., 18, p. 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, p. 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides”. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, p. 247-258.
26. Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), p. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, p. 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, p. 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, p. 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils”. J. of Soil Sci., 28, p. 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils”. Pest. Sci., 11, p. 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling”, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, p. 80-101,
36. Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure”. J. Agri. Food Chem., 15, p. 572-576.

## ▼B

37. Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. *J. Agri. Food Chem.*, 17, p. 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. *Nature*, 223, p. 1288.
39. Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. *J. Agric. Food Chem.*, 29, p. 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. *J. Agric. Food Chem.*, 32, p. 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. *Residue Rev.*, 32, p. 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. *Chemosphere* 10, p. 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. *Environ. Toxicol. Safety* 21, p. 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals” in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, p. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. *Weed Sci.* 19:67-69.
47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. *Weed Science*, Vol. 23, p. 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.



## ▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements”. *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, p. 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”. *Soil Sci.*, p. 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”. *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106” *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”. *Weed Res.* 21, p. 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”. *J. Environ. Qual.*, 10(3), p. 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), p. 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments”. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), p. 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, 16(1), p. 109-116.
68. Lyman W.J., Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, *et al.*), p. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

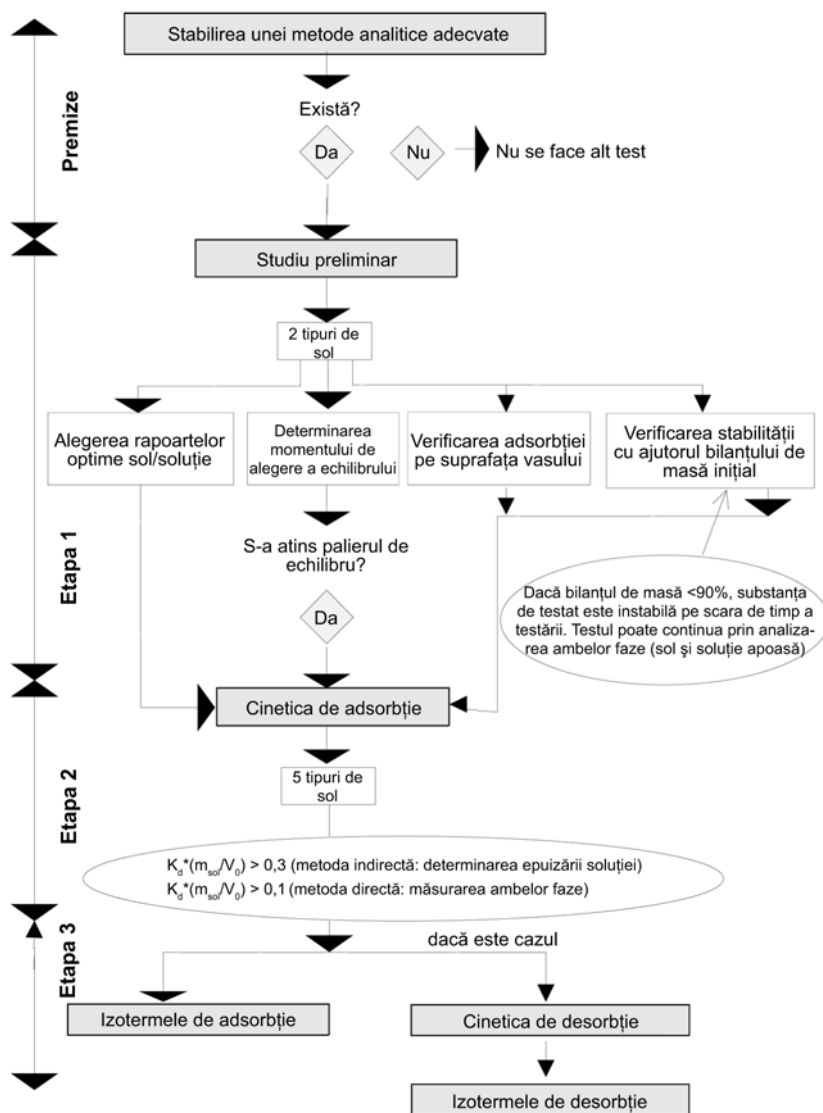
## ▼B

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. *Science*, Vol. 206, p. 831-832.
71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, p. 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), “Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – réactivité. *Revue de l’Agric.*, 34 (4), p. 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. *Chemosphere*, 32(12), p. 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. *Chemosphere* 30 (7), p. 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), “HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), p. 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. *Weed Research*, Vol. 7, p. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, p.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms” in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l’adsorption”. *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation”, *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption”, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).



# Apendicele 1

## Protocolul testului



## ▼B

## Apendicele 2

**INFLUENȚA PRECIZIEI METODEI ANALITICE ȘI A VARIAȚIEI  
CONCENTRAȚIEI ASUPRA PRECIZIEI REZULTATELOR PRIVIND  
ADSORBȚIA**

Din tabelul prezentat în continuare (84), este evident că atunci când diferența dintre masa inițială ( $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ) și masa la echilibru [ $m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec}) = 100 \mu\text{g}$ ] a substanței testate în soluție este foarte mică, o eroare de 5 % la măsurarea concentrației la echilibru conduce la o eroare de 50 % în calculul masei de substanță adsorbită în sol [ $m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})$ ] și de 52,4 % în calculul  $K_d$ .

Cantitatea de sol  $m_{\text{sol}} = 10 \text{ g}$   
Volumul soluției  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

|   | $m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$<br>( $\mu\text{g}$ ) | $C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$<br>( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) | R              | $m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})^*$<br>( $\mu\text{g}$ ) | $C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})^*$<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | $R_{\ddagger}$ | $K_d^*$ | $R_{\ddagger}$ |
|---|--|--|----------------|---|--|----------------|---------|----------------|
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ sau<br>$C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | <b>PENTRU A = 9 %</b>  |  |                |   |  |                |         |                |
|   | 100  | 1,000  | valoarea reală | 10  | 1,00   | valoarea reală | 1       |                |
|   | 101  | 1,010  | 1 %            | 9   | 0,90   | 10 %           | 0,891   | 10,9 %         |
|   | 105  | 1,050  | 5 %            | 5   | 0,50   | 50 %           | 0,476   | 52,4 %         |
|   | 109  | 1,090  | 9 %            | 1   | 0,10   | 90 %           | 0,092   | 90,8 %         |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ sau<br>$C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | <b>PENTRU A = 55 %</b>                                       |  |                |   |  |                |         |                |
|   | 50,0   | 0,500  | valoarea reală | 60,0  | 6,00   | valoarea reală | 12,00   |                |
|   | 50,5   | 0,505  | 1 %            | 59,5  | 5,95   | 0,8 %          | 11,78   | 1,8 %          |
|   | 52,5   | 0,525  | 5 %            | 57,5  | 5,75   | 4,0 %          | 10,95   | 8,8 %          |
|   | 55,0   | 0,550  | 10 %           | 55,0  | 5,50   | 8,3 %          | 10,00   | 16,7 %         |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ sau<br>$C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | <b>PENTRU A = 99 %</b>                                       |  |                |   |  |                |         |                |
|   | 1,100  | 0,011  | valoarea reală | 108,9   | 10,89  | valoarea reală | 990     |                |
|   | 1,111  | 0,01111  | 1 %            | 108,889   | 10,8889  | 0,01 %         | 980     | 1,0 %          |
|   | 1,155  | 0,01155  | 5 %            | 108,845   | 10,8845  | 0,05 %         | 942     | 4,8 %          |
|   | 1,21   | 0,0121   | 10 %           | 108,790   | 10,8790  | 0,10 %         | 899     | 9,2 %          |

unde:

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec}) = m_0 - m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec}) = \frac{[C_0 - C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})]V_0}{m_{\text{estimat}}}.K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})}{m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})} \frac{V_0}{m_{\text{estimat}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = masa substanței testate în faza de sol la echilibru,  $\mu\text{g}$

$m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = masa substanței testate în faza apoasă la echilibru,  $\mu\text{g}$

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = conținutul de substanță testată în faza de sol la echilibru,  $\mu\text{g g}^{-1}$

$C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$  = concentrația masică a substanței încercate în faza apoasă la echilibru,  $\mu\text{g cm}^{-3}$

R = eroarea analitică în determinarea  $m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$ ;

$R_{\ddagger}$  = eroarea calculată datorită erorii analitice R.



## Apendicele 3

METODE DE ESTIMARE PENTRU  $K_d$ 

1. Metodele de estimare permit estimarea  $K_d$  din corelațiile cu, de exemplu, valorile  $P_{ow}$  (12) (39) (63)-(68), datele privind solubilitatea apei (12) (19) (21) (39) (68-73) sau datele privind polaritatea, rezultate din aplicarea HPLC (cromatografia lichidă de înaltă performanță) la faza inversată (74-76). Conform celor prezentate în tabelele 1 și 2,  $K_{co}$  sau  $K_{so}$  se calculează din ecuațiile menționate și, apoi,  $K_d$  se calculează indirect din ecuațiile următoare:

$$K_{co} = K_d \cdot \frac{100}{\%CO} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{os} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%CO} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Concepția corelațiilor prezentate are în vedere două ipoteze: (1) adsorbția și desorbția sunt influențate în principal de substanța organică din sol și (2) interacțiunile implicate sunt în principal nepolare. Ca urmare, corelațiile de acest tip: (1) nu se pot aplica sau se pot aplica într-o anumită măsură la substanțele polare și (2) nu se pot aplica pentru un conținut foarte mic de substanță organică în sol (12). În afară de aceasta, deși s-au găsit corelații satisfăcătoare între  $P_{ow}$  și adsorbție (19), nu se poate spune același lucru pentru relația dintre solubilitatea apei și gradul de adsorbție (19) (21); până în prezent, studiile sunt foarte contradictorii.
3. În tabelele 1 și 2 se prezintă câteva exemple de corelații între coeficientul de adsorbție și coeficientul de partiție octanol-apă și respectiv solubilitatea în apă.

Tabelul 1

**Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și coeficientul de partiție octanol-apă; pentru alte exemple, a se vedea referințele 12 și 68**

| Substanțe           | Corelații                                   | Autori                           |
|---------------------|---|----------------------------------|
| Urei substituie     | $\log K_{so} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$     | Briggs (1981) (39)               |
| Clorurate aromat    | $\log K_{co} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$ | Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)  |
| Diferite pesticide  | $\log K_{so} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$      | Gerstl și Mingelgrin (1984) (66) |
| Hidrocarburi aromat | $\log K_{co} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$   | Vowles și Mantoura (1987) (67)   |

Tabelul 2

**Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și solubilitatea în apă; pentru alte exemple, a se vedea referințele 68 și 69**

| Substanțe                            | Corelații   | Autori                           |
|--------------------------------------|---|----------------------------------|
| Diferite pesticide                   | $\log K_{so} = 3,8 - 0,561 \log S_a$                              | Gerstl și Mingelgrin (1984) (66) |
| Substanțe clorurate aromat, alifatic | $\log K_{so} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_a$    | Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)  |
| $\alpha$ -naftol                     | $\log K_{co} = 4,273 - 0,686 \log S_a$                            | Hasset <i>et al.</i> (1981) (71) |
| Substanțe aromat, alifatic ciclice   | $\log K_{co} = - 1,405 - 0,921 \log S_a - 0,00953 (\text{mp}-25)$ | Karickhoff (1981) (72)           |
| Compuși diverși                      | $\log K_{so} = 2,75 - 0,45 \log S_a$                              | Moreale van Blade (1982) (73)    |



#### Apendicele 4

### CALCULE PENTRU STABILIREA CONDIȚIILOR DE CENTRIFUGARE

1. Timpul de centrifugare se obține cu formula următoare, considerând că particulele sunt sferice:

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{ap})} \right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Pentru simplificare, toți parametrii se exprimă în unități non-SI (g, cm).

unde:

$\omega$  = viteza rotațională (=  $2 \pi \text{ rpm}/60$ ),  $\text{rad s}^{-1}$

rpm = rotații pe minut

$\eta$  = vâscozitatea soluției,  $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$r_p$  = raza particulei, cm

$\rho_s$  = densitatea solului,  $\text{g cm}^{-3}$

$\rho_{ap}$  = densitatea soluției,  $\text{g cm}^{-3}$

$R_t$  = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la suprafața soluției din eprubeta din centrifugă, cm

$R_b$  = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la fundul eprubetei din centrifugă, cm

$R_b - R_t$  = lungimea amestecului sol/soluție în eprubeta din centrifugă, cm

În practică, se utilizează dublul timpilor calculați pentru a asigura separarea completă.

2. Ecuația (1) se mai poate simplifica, dacă se consideră că vâscozitatea ( $\eta$ ) și densitatea ( $\rho_{ap}$ ) soluției sunt egale cu vâscozitatea și densitatea apei la 25 °C; astfel,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  și  $\rho_{ap} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

Atunci, timpul de centrifugare se obține cu ecuația (2):

$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

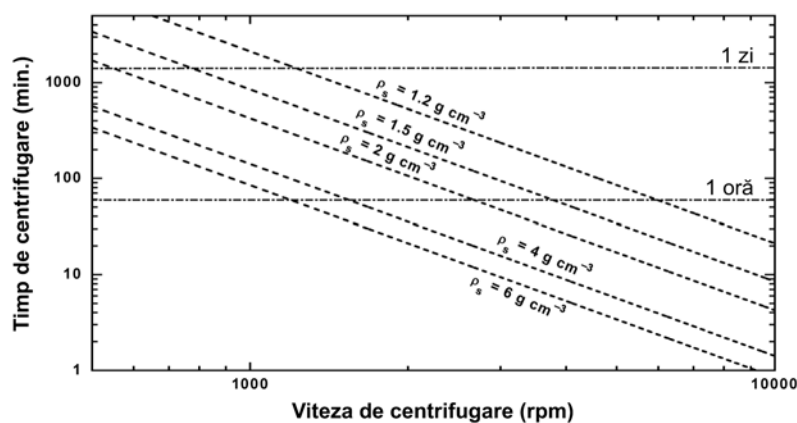
3. Din ecuația 2 se vede că doi parametri sunt importanți pentru stabilirea condițiilor de centrifugare, adică timpul ( $t$ ) și viteza (rpm), pentru a realiza separarea particulelor cu o anumită dimensiune (în cazul nostru cu raza de 0,1  $\mu\text{m}$ ): (1) densitatea solului și (2) lungimea amestecului în eprubeta din centrifugă ( $R_b - R_t$ ), adică distanța parcursă de particula de sol de la suprafața soluției până la fundul eprubetei; evident, pentru un volum stabilit, lungimea amestecului din eprubetă va depinde de pătratul razei eprubetei din centrifugă.
4. Figura 1 prezintă variațiile timpului de centrifugare ( $t$ ) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) la diferite densități ale solului ( $\rho_s$ ) (figura 1a) și diferite lungimi ale amestecului din eprubetele din centrifugă (figura 1b). Din figura 1a, este evidentă influența densității solului; de exemplu, pentru o centrifugare clasică de 3 000 rpm, timpul de centrifugare este de aproximativ 240 minute pentru o densitate a solului de 1,2  $\text{g cm}^{-3}$ , și de numai 50 minute pentru o densitate a solului de 2,0  $\text{g cm}^{-3}$ . În mod similar, din figura 1b, pentru o centrifugare clasică de 3 000 rpm timpul este de 50 minute pentru o lungime a amestecului de 10 cm și de numai 7 minute pentru o lungime de 1 cm. Cu toate acestea, este important să se găsească o relație optimă între centrifugare, care necesită o lungime cât se poate mică și ușurința manipulării de către executant la separarea fazelor după centrifugare.

## ▼ B

5. În plus, la stabilirea condițiilor experimentale pentru separarea fazelor sol/soluție, este important să se ia în considerație posibilitatea existenței unei a treia „pseudo-faze”, coloizii. Particulele de acest tip, cu o dimensiune mai mică de  $0,2 \mu\text{m}$ , pot să aibă un impact important asupra întregului mecanism de adsorbție a unei substanțe într-o suspensie de sol. Atunci când centrifugarea se realizează ca în descrierea anterioară, coloizii rămân în faza apoasă și se analizează împreună cu faza apoasă. Astfel, datele privind impactul acestora se pierd.

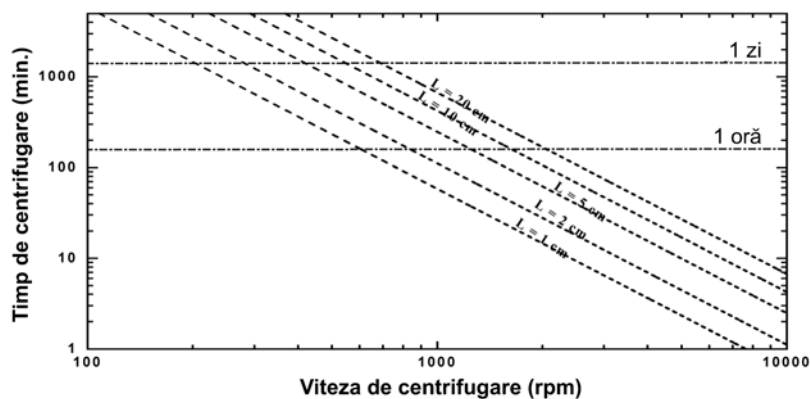
Dacă laboratorul executant posedă dispozitive de ultracentrifugare sau ultrafiltrare, ar putea fi posibil un studiu mai aprofundat al fenomenului de adsorbție/desorbție al unei substanțe în sol, care să includă date privind adsorbția substanței pe coloizi. În cazul respectiv, se aplică o ultracentrifugare la 60 000 rpm sau o ultrafiltrare cu un filtru cu porozitatea de 100 000 daltoni pentru separarea celor trei faze: sol, coloizi, soluție. Este necesar ca și protocolul testului să se modifice corespunzător, pentru ca la toate cele trei faze să se analizeze substanța.

Figura 1a.



Variațiile timpului de centrifugare ( $t$ ) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite densități ale solului ( $\rho_s$ ).  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  și  $\rho_{ap} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  la  $25^\circ \text{C}$ .

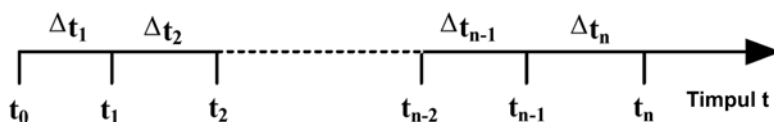
Figura 1b.



Variațiile timpului de centrifugare ( $t$ ) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite lungimi ale amestecului în eprubeta din centrifugă ( $R_b - R_t = L$ ;  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho_{ap} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  la  $25^\circ \text{C}$  și  $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

**▼ B***Apendicele 5***CALCULUL ADSORBȚIEI A (%) ȘI DESORBȚIEI D (%)**

Diagrama timpului procedurii este:



În toate calculele se consideră că substanța testată este stabilă și nu se adsorbe semnificativ pe pereții recipientului.

**ADSORBȚIA A (A %)****(a) Metoda paralelă**

Adsorbția, în procente, se calculează pentru fiecare eprubetă (i) și pentru fiecare moment ( $t_i$ ), conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Termenii ecuației anterioare se pot calcula după cum urmează:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

unde:

$A_{t_i}$  = adsorbția în procente ( %) la momentul  $t_i$ ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = masa substanței testate pe sol la timpul  $t_i$  la care se efectuează analiza ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = masa substanței testate din eprubetă, la începutul încercării ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = concentrația masică inițială a substanței din soluția de testare în contact cu solul ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );



▼ B

$C_{ap}^{ads}(t_i)$  = concentrația masică a substanței în faza apoasă la timpul  $t_i$  la care se realizează analiza ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); concentrația respectivă se determină analitic, ținând seama de valorile oferite de probele oarbe;

$V_0$  = volumul inițial al soluției testate în contact cu solul ( $\text{cm}^3$ ).

Valorile adsorbției, în procente,  $A_{t_i}$  sau  $C_{ap}^{ads}(t_i)$  se reprezintă grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de sorbție. Exemple cu aceste reprezentări grafice se prezintă în figurile 1 și, respectiv, 2.

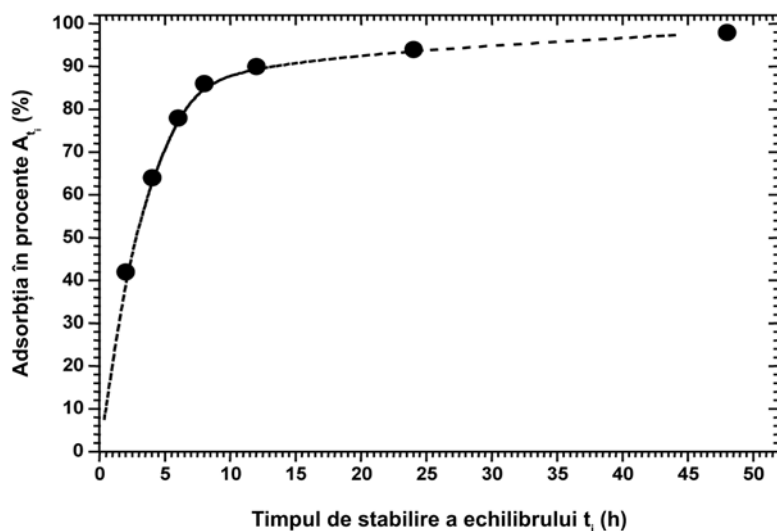


Figura 1

Reprezentarea grafică a echilibrului de adsorbție

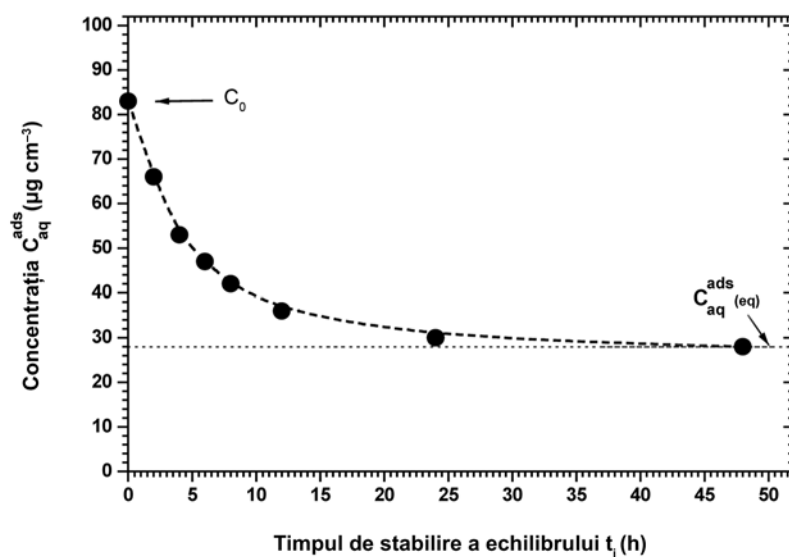


Figura 2

Concentrația masică a substanței testate în fază apoasă ( $C_{ap}$ ) în funcție de timp

**▼B**(b) *Metoda în serie*

Ecuatiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției se realizează prin măsurători ale substanței testate în mici alicoci de fază apoasă la anumite intervale de timp.

— În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță adsorbită pe sol, după cum urmează:

— pentru primul interval de timp  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— pentru al doilea interval de timp  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— pentru al treilea interval de timp  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (6)$$

— pentru al n-lea interval de timp  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

— Adsorbția, în procente, la fiecare interval de timp,  $A_{\Delta t_i}$ , se calculează cu ecuația următoare:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

în timp ce adsorbția, în procente, ( $A_{t_i}$ ) la momentul  $t_i$  se obține cu ecuația:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Valorile adsorbției  $A_{t_i}$  sau  $A_{\Delta t_i}$  (în funcție de necesitățile studiului) se reprezintă grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul sorbției.

— La momentul echilibrului  $t_{\text{ec}}$ :

— masa substanței testate adsorbite pe sol este:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{ec}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

**▼ B**

— masa substanței testate în soluție este:

$$m_{ap}^{ads}(ec) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— și adsorbția, în procente, la echilibru este:

$$A_{ec} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Parametrii din ecuațiile anterioare se definesc după cum urmează:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$  = masa substanței adsorbite pe sol în intervalele de timp  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$  și respectiv  $\Delta t_n$  ( $\mu g$ )

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$  = masa substanței, măsurată într-un alicot  $v_a^A$  în momentele  $t_1, t_2, \dots$ , respectiv  $t_n$  ( $\mu g$ )

$m_s^{ads}(ec)$  = masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție ( $\mu g$ )

$m_{ap}^{ads}(ec)$  = masa substanței în soluție la echilibrul de adsorbție ( $\mu g$ )

$v_a^A$  = volumul alicotului în care se măsoară substanța testată ( $cm^3$ )

$A_{\Delta t_i}$  = adsorbția, în procente, ce corespunde la un interval de timp  $\Delta t_i$  (%)

$A_{ec}$  = adsorbția, în procente, la echilibrul de adsorbție (%)

**DESORBȚIA D (%)**

Timpul  $t_0$ , la care începe proba pentru cinetica de desorbție, se consideră ca momentul în care volumul maxim recuperat de soluție a substanței testate (după atingerea echilibrului de adsorbție) este înlocuit de un volum egal de soluție de  $CaCl_2$  0,01 M.

**(a) Metoda paralelă**

La momentul  $t_i$ , se măsoară masa substanței testate în faza apoasă luată din eprubeta  $i$   $V_r^i$  și masa desorbită se calculează conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{ap}^A \quad (13)$$

La echilibrul de desorbție  $t_i = t_{ec}$  și, prin urmare,  $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ .

Masa substanței testate desorbite într-un interval ( $\Delta t_i$ ) este dată de ecuația:

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_i) = m_{ap}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{ap}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorbția, în procente, se calculează:

la momentul  $t_i$  din ecuația:

**▼ B**

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

și în intervalul de timp ( $\Delta t_i$ ) din ecuația:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

unde:

$D_{t_i}$  = desorbția, în procente, la momentul  $t_i$  (%)

$D_{\Delta t_i}$  = desorbția, în procente, care corespunde unui interval  $\Delta t_i$  (%)

$m_{ap}^{des}(t_i)$  = masa substanței testate desorbite la momentul  $t_i$ , (μg)

$m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$  = masa substanței testate desorbite în intervalul de timp  $\Delta t_i$  (μg)

$m_m^{des}(t_i)$  = masa substanței testate măsurate analitic la timpul  $t_i$  într-un volum de soluție  $V_r^i$ , care se ia pentru analiză (μg)

$m_{ap}^A$  = masa substanței testate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$$m_{ap}^A = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{ap}^{ads}(ec)$  = masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

$V_R$  = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit de același volum de soluție de  $CaCl_2$  0,01 M ( $cm^3$ )

$V_r^i$  = volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței testate, în proba pentru cinetica desorbției ( $cm^3$ )

Valorile desorbției  $D_{t_i}$  sau  $D_{\Delta t_i}$  (în funcție de necesitățile studiului) sunt reprezentate grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de desorbție.

(b) *Metoda în serie*

Ecuațiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției, care a avut loc anterior, s-a realizat prin măsurarea substanței testate în alicuți mici ( $v_a^A$ ) de fază apoasă (metoda în serie de la punctul 1.9 Realizarea încercării). Se consideră că: (a) volumul de supernatant scos din eprubetă după proba pentru determinarea cineticii de adsorbție a fost înlocuit cu același volum de soluție de  $CaCl_2$  0,01 M ( $V_R$ ) și (b) volumul total al fazei apoase în contact cu solul ( $V_T$ ) în timpul probei pentru determinarea cineticii de desorbție rămâne constant și este dat de ecuația:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

**▼ B**

La momentul  $t_i$ :

— masa substanței testate se măsoară într-un alicot mic ( $v_a^D$ ) și se calculează masa desorbită, conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{ap}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

— la echilibrul de desorbție  $t_i = t_{ec}$  și prin urmare  $m_{ap}^{des}(t_i) = m_{ap}^{des}(ec)$ .

— desorbția  $D_{t_i}$ , în procente, se calculează din ecuația următoare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (20)$$

La un interval de timp ( $\Delta t_i$ ):

În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță desorbită după cum urmează:

— pentru primul interval de timp  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{ap}^A \text{ și } m_s^{des}(t_1) = m_s^{ap}(ec) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pentru al doilea interval de timp  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{ap}^A \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right)$$

și

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(ec) - [m_{ap}^{des}(\Delta t_1) + m_{ap}^{des}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

— pentru al n-lea interval de timp  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_n) = \left[ m_m^{des}(t_n) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{ap}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left( \frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{ap}^{des}(\Delta t_i) \right) \right] \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(ec) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$$

În sfârșit, desorbția, în procente, la fiecare interval de timp,  $D_{\Delta t_i}$ , se calculează cu următoarea ecuație:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

în timp ce desorbția, în procente,  $D_{t_i}$  la momentul  $t_i$  este dată de ecuația:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{ap}^{des}(j)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100 = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

**▼B**

unde parametrii utilizați anterior se definesc după cum urmează:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masa substanței adsorbite în continuare pe sol după intervalele de timp  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$ , respectiv  $\Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masa substanței desorbite în intervalele de timp  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$ , respectiv  $\Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_s^{\text{des}}(t_1), m_s^{\text{des}}(t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(t_n)$  = masa substanței măsurată într-un alicot ( $v_a^D$ ) la momentele  $t_1, t_2, \dots$ , respectiv  $t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$V_T$  = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul probei de cinetică a desorbției efectuate prin metoda în serie ( $\text{cm}^3$ )

$m_{\text{ap}}^A$  = masa substanței testate rămase de la echilibrul de desorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului ( $\mu\text{g}$ )

$$m_{\text{ap}}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec}) \quad (26)$$

$V_R$  = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ )

$v_a^D$  = volumul alicotului luat pentru analiză din eprubeta (i) în timpul probei pentru cinetica desorbției realizate prin metoda în serie ( $\text{cm}^3$ )

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$



## Apendicele 6

**ADSORBȚIA – DESORBȚIA ÎN SOL: FORMULARE PENTRU RAPORTAREA DATELOR**

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Parametrii determinați prin metoda de analiză**

|  |                     |  |
|--|---------------------|--|
| Solul cântărit                           | g                   |  |
| Sol: substanța uscată                    | g                   |  |
| Volumul soluție de CaCl <sub>2</sub>     | cm <sup>3</sup>     |  |
| Concentrația nominală a soluției finale  | μg cm <sup>-3</sup> |  |
| Concentrația analitică a soluției finale | μg cm <sup>-3</sup> |  |

Principiul metodei analitice utilizate:

Etalonarea metodei analitice:

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitică urmată:                      Indirectă      ☐      Paralelă      ☐      În serie      ☐

   Directă      ☐

**Testarea de adsorbție: eșantioanele**

|  | Simbol           | Unități             | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului |
|--|------------------|---------------------|--|--|--|--|
| Nr. de eprubete  |                  |                     |  |  |  |  |
| Solul cântărit   | —                | g                   |  |  |  |  |
| Solul: substanța uscată  | m <sub>sol</sub> | g                   |  |  |  |  |
| Volumul apei din solul cântărit<br>(calculat)  | V <sub>AS</sub>  | cm <sup>3</sup>     |  |  |  |  |
| Volumul soluției de CaCl <sub>2</sub> 0,01<br>M pentru a aduce solul la echi-<br>libru |                  | cm <sup>3</sup>     |  |  |  |  |
| Volumul soluției mamă  |                  | cm <sup>3</sup>     |  |  |  |  |
| Volumul total al fazei apoase în<br>contact cu solul                                   | V <sub>0</sub>   | cm <sup>3</sup>     |  |  |  |  |
| Concentrația inițială a soluției<br>experimentale                                      | C <sub>0</sub>   | μg cm <sup>-3</sup> |  |  |  |  |
| Masa substanței testate la<br>începutul încercării                                     | m <sub>0</sub>   | μg                  |  |  |  |  |

## ▼ B

|   | Simbol              | Unități               | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului | Timpul de<br>stabilire a echi-<br>librului |
|---|---------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| <b>După agitare și centrifugare</b>   |                     |                       |  |  |  |  |
| <b>METODA INDIRECTĂ</b>   |                     |                       |  |  |  |  |
| Metoda paralelă   |                     |                       |  |  |  |  |
| Concentrația substanței testate în fază apoasă, inclusiv corecția probei martor | $C_{ap}^{ads}(t_i)$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |
| Metoda în serie   |                     |                       |  |  |  |  |
| Masa măsurată a substanței testate în alicot $V_a^A$                            | $m_m^{ads}(t_i)$    | $\mu\text{g}$         |  |  |  |  |
| <b>METODA DIRECTĂ</b>   |                     |                       |  |  |  |  |
| Masa substanței testate adsorbite pe sol  | $m_s^{ads}(t_i)$    | $\mu\text{g}$         |  |  |  |  |
| Calculul adsorbției   |                     |                       |  |  |  |  |
| Adsorbția   | $A_{t_i}$           | %                     |  |  |  |  |
|   | $A_{\Delta t_i}$    | %                     |  |  |  |  |
| Mijloacele  |                     |                       |  |  |  |  |
| Coeficientul de adsorbție   | $K_d$               | $\mu\text{g cm}^{-1}$ |  |  |  |  |
| Mijloacele  |                     |                       |  |  |  |  |
| Coeficientul de adsorbție   | $K_{co}$            | $\mu\text{g cm}^{-1}$ |  |  |  |  |
| Mijloacele  |                     |                       |  |  |  |  |

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Testarea de adsorbție: probe oarbe și martor**

|   | Simbol | Unități       | Proba oarbă | Proba oarbă | Proba martor |
|---|--------|---------------|-------------|-------------|--------------|
| Nr. de eprubete                                     |        |               |             |             |              |
| Solurile cântărite                                  |        | g             |             |             | 0 0          |
| Volumul apei din solul cântărit (calculat)          |        | $\text{cm}^3$ |             |             | — —          |
| Volumul soluției de $\text{CaCl}_2$ 0,01 M adăugate |        | $\text{cm}^3$ |             |             |              |
| Volumul soluției mamă de substanță testată adăugată |        | $\text{cm}^3$ | 0           | 0           |              |
| Volumul total al fazei apoase (calculat)            |        | $\text{cm}^3$ |             |             | — —          |



**▼B**

|   | Simbol | Unități               | Proba oarbă |  | Proba oarbă |  | Proba martor |  |
|---|--------|-----------------------|-------------|--|-------------|--|--------------|--|
| Concentrația inițială a substanței testate în fază apoasă |        | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |             |  |             |  |              |  |

**După agitare și centrifugare**

|                             |  |                       |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|--|-----------------------|--|--|--|--|--|--|
| Concentrația în fază apoasă |  | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|--|-----------------------|--|--|--|--|--|--|

Observație: Dacă este necesar, se adaugă coloane.

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Bilanțul de masă**

|  | Simbol           | Unități               |  |  |  |  |
|--|------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Nr. de eprubete  |                  |                       |  |  |  |  |
| Solul cântărit   | —                | g                     |  |  |  |  |
| Solul: substanța uscată  | $m_{\text{sol}}$ | g                     |  |  |  |  |
| Volumul apei în solul cântărit (calculat)                                    | $V_{\text{AS}}$  | ml                    |  |  |  |  |
| Volumul soluției de $\text{CaCl}_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru |                  | ml                    |  |  |  |  |
| Volumul soluției mamă  |                  | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |
| Volumul total al fazei apoase în contact cu solul                            | $V_0$            | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |
| Concentrația inițială a soluției experimentale                               | $C_0$            | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |
| Timpul de realizare a echilibrului   | —                | h                     |  |  |  |  |

**După agitare și centrifugare**

|  |   |                       |  |  |  |  |
|--|---|-----------------------|--|--|--|--|
| Concentrația substanței testate în faza apoasă la adsorbție, inclusiv corecția probei oarbe la echilibru | $C_{\text{ap}}^{\text{ads}}(\text{ec})$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |
| Timpul de realizare a echilibrului   | $t_{\text{ec}}$                         | h                     |  |  |  |  |

**Prima diluție cu solvent**

|                                  |                  |               |  |  |  |  |
|----------------------------------|------------------|---------------|--|--|--|--|
| Volumul fazei apoase îndepărtate | $V_{\text{rec}}$ | $\text{cm}^3$ |  |  |  |  |
| Volumul de solvent adăugat       | $\Delta V$       | $\text{cm}^3$ |  |  |  |  |

**Prima extracție cu solvent**

|  |                 |                       |  |  |  |  |
|--|-----------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Semnalul analizat în solvent               | $S_{\text{EI}}$ | var.                  |  |  |  |  |
| Concentrația substanței testate în solvent | $C_{\text{EI}}$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |

**▼B**

|  | Simbol   | Unități       |  |  |  |  |
|--|----------|---------------|--|--|--|--|
| Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor | $m_{E1}$ | $\mu\text{g}$ |  |  |  |  |

## A doua diluție cu solvent

|                               |              |               |  |  |  |  |
|-------------------------------|--------------|---------------|--|--|--|--|
| Volumul de solvent îndepărtat | $\Delta V_s$ | $\text{cm}^3$ |  |  |  |  |
| Volumul de solvent adăugat    | $\Delta V'$  | $\text{cm}^3$ |  |  |  |  |

## A doua extracție cu solvent

|  |          |                       |  |  |  |  |
|--|----------|-----------------------|--|--|--|--|
| Semnalul analizat în solvent                             | $S_{E2}$ | var.                  |  |  |  |  |
| Concentrația substanței testate în solvent               | $C_{E2}$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |
| Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor | $m_{E2}$ | $\mu\text{g}$         |  |  |  |  |
| Masa totală a substanței testate extrase în două etape   | $m_E$    | $\mu\text{g}$         |  |  |  |  |
| Bilanțul de masă   | BM       | %                     |  |  |  |  |

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Izotermele de adsorbție**

|  | Simbol   | Unități               |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|----------|-----------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Nr. de eprubete  |          |                       |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Solul cântărit   | —        | g                     |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Solul; substanță uscată  | E        | g                     |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Volumul de apă din solul cântărit (calculat)                                 | $V_{AS}$ | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Volumul soluției de $\text{CaCl}_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru |          | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Volumul soluției mamă adăugat  |          | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Volumul total al fazei apoase în contact cu solul (calculat)                 | $V_0$    | $\text{cm}^3$         |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Concentrația soluției  | $C_0$    | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Timpu de realizare a echilibrului  | —        | h                     |  |  |  |  |  |  |  |  |

**▼B**

|  | Simbol             | Unități          |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--------------------|------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| <b>După agitare și centrifugare</b>                                    |                    |                  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Concentrația substanței în faza apoasă, inclusiv corecția probei oarbe | $C_{ap}^{ads}(ec)$ | $\mu g\ cm^{-3}$ |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Temperatura  |                    | $^{\circ}C$      |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Masa adsorbită per unitatea de sol                                     | $C_s^{ads}(ec)$    | $\mu g\ g^{-1}$  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Analiza de regresie:

valoarea  $K_f^{ads}$ :

valoarea  $1/n$ :

coeficientul de regresie  $r^2$ :

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105  $^{\circ}C$ , 12 h): ..... %

Temperatura: .....  $^{\circ}C$

Metodologia analitică urmată: Indirectă ☐ Paralelă ☐ În serie ☐

**Testarea de desorbție**

|  |    | Simbol          | Unități | Interval de timp | Interval de timp | Interval de timp | Interval de timp |
|--|----|-----------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Nr. de eprubete ce vin de la etapa de adsorbție  |    |                 |         |                  |                  |                  |                  |
| Masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție  |    | $m_s^{ads}(ec)$ | $\mu g$ |                  |                  |                  |                  |
| Volumul fazei apoase îndepărtate, înlocuit cu soluție de $CaCl_2$ 0,01 M                               |    | $V_R$           | $cm^3$  |                  |                  |                  |                  |
| Volumul total al fazei apoase în contact cu solul  | MP | $V_0$           | $cm^3$  |                  |                  |                  |                  |
|  | MS | $V_T$           | $cm^3$  |                  |                  |                  |                  |
| Masa substanței testate rămasă după echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului |    | $m_{ap}^A$      | $\mu g$ |                  |                  |                  |                  |

**Cinetica desorbției**

|  |    |                            |         |  |  |  |  |
|--|----|----------------------------|---------|--|--|--|--|
| Masa măsurată a substanței desorbite din sol la momentul $t_i$                   |    | $m_m^{des}(t_i)$           | $\mu g$ |  |  |  |  |
| Volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței testate      | MP | $V_r^i$                    | $cm^3$  |  |  |  |  |
|  | MS | $V_a^D$                    | $cm^3$  |  |  |  |  |
| Masa substanței desorbite din sol la momentul $t_i$ (calculată)                  |    | $m_{aq}^{des}(t_i)$        | $\mu g$ |  |  |  |  |
| Masa substanței desorbite din sol în intervalul de timp $\Delta t_i$ (calculată) |    | $m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ | $\mu g$ |  |  |  |  |

**▼B**

|  | Simbol           | Unități | Interval de timp | Interval de timp | Interval de timp | Interval de timp |
|--|------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Desorbția în procente</b>                 |                  |         |                  |                  |                  |                  |
| Desorbția la momentul $t_i$                  | $D_{t_i}$        | %       |                  |                  |                  |                  |
| Desorbția în intervalul de timp $\Delta t_i$ | $D_{\Delta t_i}$ | %       |                  |                  |                  |                  |
| Coeficientul de desorbție aparent            | $K_{des}$        |         |                  |                  |                  |                  |

MP: Metoda paralelă

MS: Metoda în serie

**▼B****C.19. ESTIMAREA COEFICIENTULUI DE ADSORBȚIE ( $K_{co}$ ) PE SOL ȘI NĂMOL DE EPURARE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)****1. METODĂ**

Prezenta metodă este identică cu cea prevăzută în Orientarea 21 (2000) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Comportarea la sorbție a substanțelor din soluri și nămolurile de epurare se poate descrie cu ajutorul parametrilor determinați experimental prin metoda de testare C.18. Un parametru important este coeficientul de adsorbție care reprezintă raportul dintre concentrația substanței din sol/nămol și concentrația substanței în fază apoasă la echilibrul de adsorbție. Coeficientul de adsorbție normalizat la conținutul de carbon organic al solului  $K_{co}$  este un indicator util al capacității de fixare a unei substanțe chimice pe o substanță organică din sol și din nămolul de epurare și permite compararea diferitelor substanțe chimice. Parametrul menționat se poate estima prin corelări cu solubilitatea apei și coeficientul de partiție n-octanol/apă (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Metoda experimentală descrisă în prezenta testare utilizează HPLC pentru estimarea coeficientului de adsorbție  $K_{co}$  în sol și în nămolul de epurare (8). Estimările prezintă o credibilitate mai mare decât cele din calculele de relație cantitativă structură-activitate [RCSA (QSAR)] (9). Ca metodă de estimare, aceasta nu poate înlocui în întregime încercările de realizare a echilibrului probelor utilizate în metoda de testare C.18. Cu toate acestea,  $K_{co}$  estimat poate fi util în alegerea parametrilor optimi de testare pentru studiile de adsorbție/desorbție conform metodei de testare C.18, prin calcularea  $K_d$  (coeficientul de distribuție) sau  $K_f$  (coeficientul de adsorbție Freundlich) conform ecuației 3 (punctul 1.2).

**1.2. DEFINIȚII**

**$K_d$ :** Coeficientul de distribuție este raportul dintre concentrațiile la echilibru,  $C$ , ale unei substanțe testate dizolvate într-un sistem bifazic ce conține un adsorbant (sol sau nămol de epurare) și o fază apoasă; este o valoare adimensională atunci când concentrațiile în ambele faze se exprimă în greutate/greutate. Pentru concentrația în faza apoasă exprimată în greutate/volum, unitățile sunt  $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ .  $K_d$  poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului și poate să fie dependent de concentrație.

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{ap}} \text{ sau } \frac{C_{nămol}}{C_{ap}} \quad (1)$$

unde:

$C_{sol}$  = concentrația substanței testate în sol la echilibru ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$C_{nămol}$  = concentrația substanței testate în nămol la echilibru ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$C_{ap}$  = concentrația substanței testate în faza apoasă la echilibru ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

**▼ B**

**K<sub>f</sub>**: Coeficientul de adsorbție Freundlich este concentrația substanței testate în sol sau nămolul de epurare (x/m) atunci când concentrația la echilibru, C<sub>ap</sub>, în faza apoasă este egală cu unu; unitățile sunt μg g<sup>-1</sup> adsorbant. Valoarea poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{ap} \quad (2)$$

unde:

x/m = cantitatea de substanță testată x (μg) adsorbită pe cantitatea de adsorbant m (g) la echilibru

1/n = panta izotermei de adsorbție Freundlich

C<sub>ap</sub> = concentrația substanței testate în fază apoasă la echilibru (μg · ml<sup>-1</sup>).

Pentru C<sub>ap</sub> = 1; log K<sub>f</sub> = log  $\frac{x}{m}$

**K<sub>co</sub>**: Coeficientul de distribuție (K<sub>d</sub>) sau coeficientul de adsorbție Freundlich (K<sub>f</sub>) normalizat la conținutul de carbon organic (f<sub>co</sub>) al adsorbantului; în special pentru substanțele chimice neionizate, este un indicator aproximativ al gradului de adsorbție între o substanță și adsorbant și permite compararea diferitelor substanțe chimice. În funcție de dimensiunile K<sub>d</sub> și K<sub>f</sub>, K<sub>co</sub> poate să fie adimensional sau să aibă unitățile ml g<sup>-1</sup> sau μg g<sup>-1</sup> substanță organică.

$$K_{co} = \frac{K_d}{f_{co}} \text{ (adimensional sau ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{) sau } \frac{K_f}{f_{co}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Relația dintre K<sub>co</sub> și K<sub>d</sub> nu este lineară întotdeauna și, prin urmare, valorile K<sub>co</sub> pot să varieze de la un sol la altul, dar gradul de variație a acestora este redus în mare măsură în comparație cu valorile K<sub>d</sub> sau K<sub>f</sub>.

Coeficientul de adsorbție (K<sub>co</sub>) se obține din factorul de capacitate (k'), utilizând o curbă de etalonare obținută prin reprezentarea grafică a log k' în funcție de log K<sub>co</sub> pentru compușii de referință selectați.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

unde:

t<sub>g</sub> = timpul de retenție HPLC pentru testare și substanța de referință (minute)

t<sub>0</sub> = timpul mort HPLC (minute) (a se vedea punctul 1.8.2).

**P<sub>ow</sub>**: Coeficientul de partiție octanol-apă reprezintă raportul dintre concentrațiile substanței dizolvate în n-octanol și apă; este o mărime adimensională.

$$Pow = \frac{C_{octanol}}{C_{ap}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Înainte de utilizarea metodei, este necesar să se cunoască formula structurală, puritatea și constanta de disociere (dacă este cazul). Sunt utile datele privind solubilitatea în apă și solvenți organici, coeficientul de partiție octanol-apă și caracteristicile hidrolizei.

## ▼B

Pentru a corela datele de retenție HPLC măsurate pentru o substanță testată cu coeficientul de adsorbție al acesteia  $K_{co}$ , trebuie să se reprezinte grafic curba de etalonare pentru  $\log K_{co}$  în funcție de  $\log k'$ . Trebuie să se utilizeze cel puțin șase puncte, cel puțin unul peste și unul sub valoarea preconizată pentru substanța testată. Acuratețea metodei este mult îmbunătățită, dacă se utilizează substanțe de referință cu structura asemănătoare cu a substanței testate. Dacă astfel de date nu sunt disponibile, este la latitudinea utilizatorului să aleagă substanțele de etalonare potrivite. În acest caz, este necesar să se aleagă un set mai general de substanțe eterogene din punct de vedere structural. Substanțele și valorile  $K_{co}$  care se pot utiliza sunt prezentate în apendice, în tabelul 1 pentru nămolul de epurare și în tabelul 3 pentru sol. Alegerea altor substanțe de etalonare se justifică.

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

HPLC se realizează pe o coloană analitică umplută cu o fază solidă de cianopropil care se comercializează și care conține grupe liofile și polare. Se utilizează o fază staționară polară din matrice de silice.

|          |   |              |
|----------|---|--------------|
| - O - Si | - CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> | - CN         |
| silice   | distanțier nepolar                                    | grupă polară |

Principiul metodei de testare este similar cu cel al metodei de testare A.8 (coeficientul de partiție, metoda HPLC). Când trece prin coloană în lungul fazei mobile, substanța testată interacționează cu faza staționară. Ca urmare a partiției dintre faza mobilă și cea staționară, substanța testată este întârziată. Compoziția dublă a fazei staționare, care are porțiuni polare și nepolare, permite interacțiunea grupelor polare și nepolare dintr-o moleculă într-un mod similar cu cel pentru substanța organică din matricele de sol sau nămol de epurare. Aceasta permite stabilirea relației dintre timpul de retenție pe coloană și coeficientul de adsorbție pe substanța organică.

pH-ul are o influență importantă în mod deosebit asupra comportamentului de sorbție al substanțelor polare. Pentru solurile agricole sau rezervoarele stațiilor de tratare a apelor reziduale, pH-ul variază de obicei între 5,5 și 7,5. Pentru substanțele ionizabile, trebuie să se efectueze două testări, atât cu forma ionizată, cât și cu cea neionizată în soluții tampon corespunzătoare, dar numai pentru situațiile în care cel puțin 10 % din compusul testat se disociază între valorile pH-ului 5,5-7,5.

Deoarece pentru evaluare se utilizează doar relația dintre retenția pe coloana HPLC și coeficientul de adsorbție, nu este necesară o metodă analitică cantitativă, ci doar determinarea timpului de retenție. Dacă este disponibil un set corespunzător de substanțe de referință și se pot utiliza condițiile de testare standard, metoda oferă un mod rapid și eficient pentru estimarea coeficientului de adsorbție  $K_{co}$ .

## 1.5. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda HPLC se poate aplica substanțelor chimice (nemarcate și marcate) pentru care există un sistem corespunzător de detecție (de exemplu spectrofotometru, detector de radioactivitate) și care sunt suficient de stabile în timpul testării. Această metodă poate să fie deosebit de utilă pentru substanțele chimice dificil de studiat în alte sisteme experimentale (adică substanțele volatile; substanțe care nu sunt solubile în apă la o concentrație care să poată fi măsurată analitic; substanțe cu afinitate mare pentru suprafața sistemelor de incubare). Metoda se poate utiliza la amestecurile care dau benzi de eluție neparate. În acest caz, este necesar să se stabilească limitele superioară și inferioară ale valorilor  $\log K_{co}$  pentru compușii amestecului testat.

**▼B**

Impuritățile pot să creeze uneori probleme în interpretarea rezultatelor HPLC, dar sunt de importanță minoră atâta timp cât substanța testată se poate identifica și separa analitic în mod clar de impurități.

Metoda este validată pentru substanțele prezentate în tabelul 1 din appendice și a fost de asemenea aplicată pentru o serie de alte substanțe din următoarele clase de substanțe chimice:

- amine aromate (de exemplu trifluralin, 4-cloroanilină, 3,5-dinitroanilină, 4-metilanilină, N-metilanilină, 1-naftilamină), esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic;
- esteri ai acizilor carboxilici aromați (de exemplu esterul metilic al acidului benzoic, esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic);
- hidrocarburi aromate (de exemplu toluen, xilen, etilbenzen, nitrobenzen);
- esteri ai acizilor ariloxifenoxipropionici (de exemplu metil-diclofop, etil-fenoxaprop, p-etil-fenoxaprop);
- fungicide pe bază de benzimidazol sau imidazol (de exemplu carbendazim, fuberidazol, triazoxid);
- amide ale acizilor carboxilici (de exemplu 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida);
- hidrocarburi clorurate (de exemplu endosulfan, DDT, hexaclorobenzen, quintozen, 1,2,3-triclorobenzen);
- insecticide organofosforoase (de exemplu metil-azinfos, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);
- fenoli (de exemplu fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol);
- derivați de feniluree (de exemplu izoproturon, monolinuron, pencycuron);
- pigmenți coloranți (de exemplu Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- hidrocarburi poliaromate (de exemplu acenaften, naftalen);
- ierbicide pe bază de 1,3,5-triazine (de exemplu prometrin, propazină, simazină, terbutrin);
- derivați de triazol (de exemplu tebuconazol, triadimefon, triadimenol, triapentenol).

Prezenta metodă nu se poate aplica la substanțele care reacționează fie cu eluentul, fie cu faza staționară. De asemenea, nu se aplică la substanțele care interacționează în mod specific cu componentele anorganice (de exemplu formarea de complecși ramificați cu mineralele din argilă). Este posibil ca metoda să nu funcționeze la substanțele tensioactive, compușii anorganici și acizii și bazele organici(e) moderați(e) sau puternici(e). Se pot determina valorile  $\log K_{co}$  cuprinse între 1,5 și 5,0. Determinarea substanțelor ionizabile trebuie să se realizeze cu o fază mobilă tamponată, dar trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea componentelor tamponului sau a substanței testate.



**▼B****1.6. CRITERII DE CALITATE****1.6.1. Acuratețea**

De obicei, coeficientul de adsorbție al unei substanțe testate se poate estima cu o aproximație de  $\pm 0,5$  dintr-o unitate logaritmică din valoarea determinată prin metoda de stabilire a echilibrului probelor (tabelul 1 din apendice). Dacă substanțele de referință utilizate au structuri asemănătoare cu cea a substanței testate, se poate obține o acuratețe mai mare.

**1.6.2. Repetabilitatea**

Determinările trebuie să se facă cel puțin în dublu exemplar. Valorile  $\log K_{co}$  obținute din măsurătorile individuale trebuie să se situeze într-un interval de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

**1.6.3. Reproducibilitatea**

Experiența acumulată până în prezent în aplicarea metodei susține valabilitatea acesteia. Un studiu prin metoda HPLC, în care s-au utilizat 48 substanțe (majoritatea pesticide) pentru care existau date credibile privind  $K_{co}$  pentru soluri, a dat un coeficient de corelare  $R = 0,95$  (10) (11).

S-a realizat un studiu comparativ între laboratoare, cu participarea a 11 laboratoare, pentru îmbunătățirea și validarea metodei (12). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 din apendice.

**1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.7.1. Estimarea preliminară a coeficientului de adsorbție**

Coeficientul de partiție octanol-apă  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) și, într-o anumită măsură, solubilitatea în apă se pot utiliza ca indicatori pentru gradul de adsorbție, în special pentru substanțele neionizate și, prin urmare, se pot utiliza pentru aflarea preliminară a domeniului. Au fost publicate o serie de corelații utile pentru câteva grupe de substanțe chimice (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

**1.7.2. Aparatura**

Este necesar un cromatograf lichid prevăzut cu o pompă fără impulsuri și cu un dispozitiv potrivit de detecție. Se recomandă utilizarea unui injector cu buclă de injecție. Se utilizează rășini pe bază de cianopropil fixat chimic pe suport de silice (de exemplu Hypersil și Zorax CN). O coloană de protecție din același material se poate instala între sistemul de injecție și coloana analitică. Coloanele provenite de la diverși furnizori pot să aibă randamente de separare foarte diferite. Pentru orientare, este necesar să se obțină următorii factori de capacitate  $k'$ :  $\log k' > 0,0$  pentru  $\log K_{co} = 3,0$  și  $\log k' > -0,4$  pentru  $\log K_{co} = 2,0$  atunci când se utilizează amestec metanol/apă 55/45 % ca fază mobilă.

**1.7.3. Fazele mobile**

Au fost testate câteva faze mobile și se recomandă următoarele două:

— metanol/apă (55/45 % v/v);

— metanol/tampon citrat 0,01 M, pH 6,0 (55/45 % v/v)

**▼B**

Se utilizează metanolul de tip HPLC și apă distilată sau tampon citrat pentru prepararea solventului de eluție. Amestecul se dezaerează înainte de utilizare. Se utilizează eluția izocratică. Dacă amestecurile metanol/apă nu sunt corespunzătoare, se pot încerca alte amestecuri solvent organic/apă, de exemplu amestecurile etanol/apă sau acrilonitril/apă. Pentru compuși ionizabili se recomandă utilizarea soluției tampon pentru stabilizarea pH-ului. Trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea sărurilor și deteriorarea coloanei, care pot să apară la unele amestecuri fază organică/tampon.

Nu se pot utiliza aditivi cum ar fi reactivi cu perechi de ioni, deoarece pot să afecteze proprietățile de sorbție ale fazei staționare. Astfel de modificări ale fazei staționare pot să fie ireversibile. Din acest motiv, este obligatoriu ca testele cu aditivi să se efectueze pe coloane separate.

#### 1.7.4. **Substanța dizolvată**

Substanțele testate și de referință se dizolvă în faza mobilă.

### 1.8. DESFĂȘURAREA TESTULUI

#### 1.8.1. **Condiții de testare**

Este necesară înregistrarea temperaturii în timpul măsurătorilor. Pentru asigurarea condițiilor constante în timpul etalonării și estimării și măsurării substanței testate, se recomandă cu stringență utilizarea unui compartiment termoreglabil pentru coloană.

#### 1.8.2. **Determinarea timpului mort $t_0$**

Pentru determinarea timpului mort  $t_0$ , se pot utiliza două metode diferite (a se vedea și punctul 1.2).

##### 1.8.2.1. *Determinarea timpului mort $t_0$ cu ajutorul seriilor omoloage*

S-a dovedit că procedeul de acest tip dă valori  $t_0$  credibile și standardizate. Pentru detalii, a se vedea metoda de testare A.8 Coeficientul de partiție (n-octanol/apă), metoda HPLC.

##### 1.8.2.2. *Determinarea timpului mort $t_0$ cu substanțe inerte care nu sunt reținute pe coloană*

Procedeul menționat se bazează pe injecția soluțiilor de formamidă, uree sau nitrat de sodiu. Măsurătorile se realizează cel puțin de două ori.

#### 1.8.3. **Determinarea timpilor de retenție $t_R$**

Se procedează la selectarea substanțelor de referință conform punctului 1.3. Acestea se pot injecta ca amestec etalon pentru determinarea timpilor lor de retenție, cu condiția confirmării că timpul de retenție pentru fiecare etalon nu este afectat de prezența altor etaloane de referință. Etalonarea se face la intervale regulate, cel puțin de două ori pe zi, datorită modificărilor neașteptate în funcționarea coloanei. Pentru cea mai bună practică, injecțiile de etalonare se realizează înainte și după injecțiile de substanță testată pentru a confirma că timpii de retenție nu au fost deplasați. Substanțele testate se injectează separat în cantități cât se poate de mici (pentru a evita supraîncărcarea coloanei) și se determină timpii de retenție pentru acestea.

**▼B**

Pentru a crește încrederea în măsurători, trebuie să se realizeze cel puțin două determinări. Valorile  $\log K_{co}$  obținute din măsurători individuale trebuie să se încadreze într-o valoare de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

#### 1.8.4. Evaluarea

Se calculează factorii de capacitate  $k'$  din timpul mort  $t_0$  și timpii de retenție  $t_R$  pentru substanțele de referință selectate conform ecuației 4 (punctul 1.2). Apoi, se reprezintă grafic valorile  $\log k'$  ale substanțelor de referință în funcție de valorile  $\log K_{co}$  ale acestora, obținute din testele cu realizarea echilibrului probelor, prezentate în tabelele 1 și 3 din apendice. Din reprezentarea grafică menționată, valoarea  $\log k'$  a unei substanțe testate se utilizează apoi pentru determinarea valorii  $\log K_{co}$  a acesteia. Dacă rezultatele reale indică o valoare a  $\log K_{co}$  pentru substanța testată în afara domeniului de etalonat, testarea se repetă, utilizând alte substanțe de referință mai potrivite.

## 2. DATE ȘI RAPORT

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

- identitatea testului și a substanțelor de referință și puritatea acestora și valorile  $pK_a$ , dacă sunt importante;
- descrierea aparaturii și a condițiilor de operare, de exemplu tipul și dimensiunea coloanei analitice (și a celei de protecție), mijloacele de detecție, faza mobilă (raportul componentelor și valoarea  $pH$ ), valorile temperaturii în timpul măsurătorilor;
- timpul mort și metoda utilizată pentru determinarea acestuia;
- cantitățile de substanțe testate și de referință introduse în coloană;
- timpii de retenție pentru compușii de referință utilizați la etalonare;
- detalii privind linia de regresie ajustată ( $\log k'$  în funcție de  $\log K_{co}$ ) și un grafic al liniei de regresie;
- datele medii de retenție și valoarea estimată a  $\log K_{co}$  pentru compusul testat;
- cromatogramele.

## 3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
2. J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, p. 1-67.
3. G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.
4. C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, p. 227-231.
5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 297-312.

**▼B**

6. C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, p. 831-832.
7. S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, p. 833-846.
8. W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), p. 121-128.
9. M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), p. 2493-2504.
10. W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), p. 2341-2352.
11. B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, p. 285-304.
12. W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), p. 1373-1384.



# Apendice

Tabelul 1

**Compararea valorilor  $K_{co}$  pentru soluri și nămoluri de epurare și valorile calculate cu ajutorul metodei selective HPLC <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>**

| Substanța                           | Nr. CAS   | Log $K_{co}$ nămoluri de epurare | Log $K_{co}$ HPLC | $\Delta$ | Log $K_{co}$ soluri | Log $K_{co}$ HPLC | $\Delta$ |
|-------------------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------|----------|---------------------|-------------------|----------|
| Atrazină                            | 1912-24-9 | 1,66                             | 2,14              | 0,48     | 1,81                | 2,20              | 0,39     |
| Linuron                             | 330-55-2  | 2,43                             | 2,96              | 0,53     | 2,59                | 2,89              | 0,30     |
| Fention                             | 55-38-9   | 3,75                             | 3,58              | 0,17     | 3,31                | 3,40              | 0,09     |
| Monuron                             | 150-68-5  | 1,46                             | 2,21              | 0,75     | 1,99                | 2,26              | 0,27     |
| Fenantren                           | 85-01-8   | 4,35                             | 3,72              | 0,63     | 4,09                | 3,52              | 0,57     |
| Esterul fenilic al acidului benzoic | 93-99-2   | 3,26                             | 3,03              | 0,23     | 2,87                | 2,94              | 0,07     |
| Benzamidă                           | 55-21-0   | 1,60                             | 1,00              | 0,60     | 1,26                | 1,25              | 0,01     |
| 4-Nitrobenzamidă                    | 619-80-7  | 1,52                             | 1,49              | 0,03     | 1,93                | 1,66              | 0,27     |
| Acetanilidă                         | 103-84-4  | 1,52                             | 1,53              | 0,01     | 1,26                | 1,69              | 0,08     |
| Anilină                             | 62-53-3   | 1,74                             | 1,47              | 0,27     | 2,07                | 1,64              | 0,43     |
| 2,5-Dicloroanilină                  | 95-82-9   | 2,45                             | 2,59              | 0,14     | 2,55                | 2,58              | 0,03     |

<sup>(1)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.

<sup>(2)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), p. 107-119.

Tabelul 2

**Rezultatele studiului comparativ între laboratoare (11 laboratoare participante) efectuat pentru îmbunătățirea și validarea metodei HPLC <sup>(1)</sup>**

| Substanța    | Nr. CAS    | Log $K_{co}$ | $K_{co}$    | log $K_{co}$ |
|--------------|------------|--------------|-------------|--------------|
|              |            | (OCDE 106)   | metoda HPLC |              |
| Atrazină     | 1912-24-9  | 1,81         | 78 ± 16     | 1,89         |
| Monuron      | 150-68-5   | 1,99         | 100 ± 8     | 2,00         |
| Triapentenol | 77608-88-3 | 2,37         | 292 ± 58    | 2,47         |
| Linuron      | 330-55-2   | 2,59         | 465 ± 62    | 2,67         |
| Fention      | 55-38-9    | 3,31         | 2062 ± 648  | 3,31         |

<sup>(1)</sup> W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.



Tabelul 3

## Substanțele de referință recomandate pentru metoda selectivă HPLC pe baza datelor de adsorbție pe sol

| Substanța de referință  | Nr. CAS                  | Valorile medii ale log K <sub>co</sub> din echilibrul probelor | Nr. de date K <sub>co</sub> | Log D. S. | Sursa |
|-------------------------|--------------------------|--|-----------------------------|-----------|-------|
| Acetanilidă             | 103-84-4                 | 1,25   | 4                           | 0,48      | (a)   |
| Fenol                   | 108-95-2                 | 1,32   | 4                           | 0,70      | (a)   |
| 2-Nitrobenzamidă        | 610-15-1                 | 1,45   | 3                           | 0,90      | (b)   |
| N, N-dimetilbenzamidă   | 611-74-5                 | 1,52   | 2                           | 0,45      | (a)   |
| 4-Metilmenzamidă        | 619-55-6                 | 1,78   | 3                           | 1,76      | (a)   |
| Metilbenzoat            | 93-58-3                  | 1,80   | 4                           | 1,08      | (a)   |
| Atrazină                | 1912-24-9                | 1,81   | 3                           | 1,08      | (c)   |
| Izoproturon             | 34123-59-6               | 1,86   | 5                           | 1,53      | (c)   |
| 3-Nitrobenzamidă        | 645-09-0                 | 1,95   | 3                           | 1,31      | (b)   |
| Anilină                 | 62-53-3                  | 2,07   | 4                           | 1,73      | (a)   |
| 3,5-Dinitrobenzamidă    | 121-81-3                 | 2,31   | 3                           | 1,27      | (b)   |
| Carbendazim             | 10605-21-7               | 2,35   | 3                           | 1,37      | (c)   |
| Triadimenol             | 55219-65-3               | 2,40   | 3                           | 1,85      | (c)   |
| Triazoxid               | 72459-58-6               | 2,44   | 3                           | 1,66      | (c)   |
| Triazofos               | 24017-47-8               | 2,55   | 3                           | 1,78      | (c)   |
| Linuron                 | 330-55-2                 | 2,59   | 3                           | 1,97      | (c)   |
| Naftalen                | 91-20-3                  | 2,75   | 4                           | 2,20      | (a)   |
| Endosulfan-diol         | 2157-19-9                | 3,07   | 5                           | 2,29      | (c)   |
| Metiocarb               | 2032-65-7                | 3,10   | 4                           | 2,39      | (c)   |
| Acid Yellow 219         | 63405-85-6               | 3,16   | 4                           | 2,83      | (a)   |
| 1,2,3-Triclorobenzen    | 87-61-6                  | 3,16   | 4                           | 1,40      | (a)   |
| γ-HCH                   | 58-89-9                  | 3,23   | 5                           | 2,94      | (a)   |
| Fention                 | 55-38-9                  | 3,31   | 3                           | 2,49      | (c)   |
| Direct Red 81           | 2610-11-9                | 3,43   | 4                           | 2,68      | (a)   |
| Pirazofos               | 13457-18-6               | 3,65   | 3                           | 2,70      | (c)   |
| α-Endosulfan            | 959-98-8                 | 4,09   | 5                           | 3,74      | (c)   |
| Metil-diclofop          | 51338-27-3               | 4,20   | 3                           | 3,77      | (c)   |
| Fenantren               | 85-01-8                  | 4,09   | 4                           | 3,83      | (a)   |
| Basic Blue 41 (amestec) | 26850-47-5<br>12270-13-2 | 4,89   | 4                           | 4,46      | (a)   |
| DDT                     | 50-29-3                  | 5,63   | 1                           | —         | (b)   |

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, p. 285-304.

(c) Date din industrie.

**▼B****C.20. TEST DE REPRODUCERE PENTRU *DAPHNIA MAGNA*****1. METODĂ**

Prezenta metodă de testare a toxicității pentru reproducere reproduce Orientarea 211 (1998) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Obiectivul principal al testului este evaluarea efectului produselor chimice asupra randamentului de reproducere al *Daphnia magna*.

**1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

**Animale părinți:** sunt acele femele de dafnia prezente la începutul testului și al căror randament de reproducere constituie obiectul studiului.

**Progenitură:** exemplarele tinere de dafnia produse de animalele părinți în cursul testului.

**Concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO):** este concentrația cea mai mică experimentată la care se observă un efect important al substanței din punct de vedere statistic asupra reproducerii și mortalității părinților (la  $p < 0,05$ ) în comparație cu martorul, într-un timp de expunere stabilit. Cu toate acestea, toate concentrațiile experimentate mai mari decât CMEO trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la CMEO. Când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie să se prezinte o explicație completă a modului de alegere a CMEO (și, prin urmare, CFEO).

**Concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO):** este concentrația experimentată imediat sub CMEO, care, în comparație cu martorul, nu are un efect important din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ), într-un timp de expunere stabilit.

**CE<sub>x</sub>:** este concentrația substanței testate dizolvate în apă care generează o reducere de x % a reproducerii la *Daphnia magna* într-un timp de expunere stabilit.

**Rata intrinsecă de înmulțire:** este o măsură a creșterii populației care cuprinde capacitatea de reproducere și mortalitatea specifică vârstei (20) (21) (22). La populațiile în stare stabilă, aceasta va fi egală cu zero. La populațiile în creștere, aceasta va fi pozitivă și la populațiile în scădere, va fi negativă. Este clar că aceasta din urmă nu este de susținut și în final va duce la dispariție.

**Limita de detecție:** este cea mai mică concentrație care se poate detecta dar nu se poate măsura.

**Limita de determinare:** este cea mai mică concentrație care se poate determina cantitativ.

**Mortalitatea:** un animal se înregistrează ca mort atunci când este imobil, adică atunci când nu poate să înoate sau dacă nu se observă o mișcare a organelor externe sau a post-abdomenului, în 15 secunde de la o ușoară agitare a recipientului experimental (dacă se utilizează o altă definiție, aceasta se specifică împreună cu sursa bibliografică).

## ▼B

## 1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Femelele tinere de dafnia (animale părinți), în vârstă de mai puțin de 24 ore la începutul testului, sunt expuse la substanța testată, adăugată într-o serie de concentrații diferite. Durata testului este de 21 de zile. La sfârșitul testului, se evaluează numărul total de progenituri în viață produse per animal părinte viu la sfârșitul testului. Aceasta înseamnă că tineretul produs de adulții care mor în timpul testului este exclus din calcule. Capacitatea de reproducere a animalelor părinți se poate exprima în alte moduri (de exemplu numărul de progenituri în viață produse per animal per zi, din prima zi în care s-au observat progeniturile), dar acestea se semnalează în afară de numărul total de tineret produs per părinte viu la sfârșitul testului. Capacitatea de reproducere a animalelor expuse la substanța testată se compară cu aceea a martorului (martorilor) pentru a determina concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) și, din aceasta, concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO). În afară de aceasta și în măsura în care este posibil, rezultatele sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie pentru estimarea concentrației care ar putea să provoace o reducere cu  $x$  % a capacității de reproducere (adică  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  sau  $CE_{10}$ ).

De asemenea, se semnalează supraviețuirea animalelor părinți și timpul producerii primilor pui. Se mai pot studia alte efecte aferente substanței asupra unor parametri cum ar fi creșterea (de exemplu lungimea) și posibil rata intrinsecă de înmulțire.

## 1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

Datele unui test de toxicitate acută (metoda C.2, partea I) efectuat cu *Daphnia magna* trebuie să fie disponibile. Rezultatul poate să fie util la selectarea unui domeniu potrivit de concentrații experimentale în testele de reproducere. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă și presiunea de vapori a substanței testate și să existe o metodă analitică fiabilă pentru determinarea cantitativă a substanței în soluțiile experimentale, cu eficiența recuperării și limita de detecție specificate.

Datele privind substanța testată, care pot să fie utile în stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  și rezultatele testului pentru biodegradabilitate imediată (a se vedea metoda C.4).

## 1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, martorul (martorii) trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

- mortalitatea animalelor părinți (femele de dafnia) să nu depășească 20 % la sfârșitul testului;
- numărul mediu de progenituri vii produse per animal părinte supraviețuitor la sfârșitul testului să fie  $\geq 60$ .

## 1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## 1.6.1. Aparatură

Vasele experimentale și altă aparatură care vine în contact cu soluțiile experimentale trebuie să fie realizate în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. De obicei, vasele experimentale sunt pahare de laborator.

În afară de acestea, mai sunt necesare următoarele aparate:

- contor de oxigen (cu microelectrod sau alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în probe de volum mic);



**▼B**

- aparat specific pentru controlul temperaturii;
- pH-metru;
- aparat pentru determinarea durității apei;
- aparat pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT) în apă sau aparat pentru determinarea consumului chimic de oxigen (CCO);
- aparat specific pentru controlul regimului de iluminare și măsurarea intensității luminii.

**1.6.2. Organismul de testare**

Specia utilizată în test este *Daphnia magna* Straus. Se pot utiliza și alte specii de dafnia, cu condiția ca acestea să îndeplinească criteriile de validitate după caz (criteriul de validitate referitor la capacitatea de reproducere la martori trebuie să fie relevant pentru speciile dafnia). Dacă se utilizează alte specii de dafnia, acestea trebuie să se identifice în mod clar și să se justifice utilizarea lor.

De preferință, clonul trebuie să fi fost identificat după genotip. Studiul (1) a arătat că performanța de reproducere a clonului A (care provine din IRCHA din Franța) (3) satisface complet criteriile de validitate pentru o medie de  $\geq 60$  progenituri per animal părinte supraviețuitor atunci când se cultivă în condițiile descrise în prezenta metodă. Cu toate acestea, se acceptă și alți cloni, cu condiția să se indice îndeplinirea criteriilor de validitate pentru test de către cultura de dafnia.

La începutul testului, animalele trebuie să fie mai tinere de 24 ore și nu trebuie să fie prima generație. Acestea trebuie să provină dintr-o colonie sănătoasă (adică fără semne de stres, cum ar fi mortalitatea mare, prezența masculilor și ephippia, întârziere în producerea primilor descendenți, animale decolorate etc.). Animalele din colonie trebuie ținute în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu, hrană și număr de animale per unitatea de volum) similare cu cele utilizate în test. Dacă mediul de cultură ce urmează să fie utilizat în test este diferit de cel pentru cultura obișnuită de dafnia, este o bună practică să se includă o perioadă de aclimatizare înaintea testului, de obicei de aproximativ trei săptămâni (adică o generație), pentru a evita stresarea animalelor părinți.

**1.6.3. Mediul de testare**

În prezentul test, se recomandă utilizarea unui mediu bine definit. Acesta poate să evite utilizarea aditivilor (de exemplu plante de mare, extract de sol etc.) a căror caracterizare este dificilă și, prin urmare, se îmbunătățesc posibilitățile de standardizare între laboratoare. S-a găsit că mediile Elendt M4 (4) și M7 (a se vedea apendicele 1) sunt potrivite în acest sens. Cu toate acestea, se pot accepta și alte medii [de exemplu (5) (6)], cu condiția să asigure realizarea unei culturi de dafnia care să îndeplinească criteriile de validitate pentru test.

Dacă se utilizează medii ce conțin aditivi care nu sunt caracterizați, este necesar ca aditivii respectivi să se specifice clar și, în raportul de testare, să se prezinte date privind compoziția, în special conținutul de carbon, deoarece acesta poate contribui la hrana furnizată. Se recomandă determinarea concentrației totale de carbonului organic (COT) și a consumului chimic de oxigen (CCO) la prepararea amestecului de aditivi organici și să se facă o estimare a contribuției rezultate la COT/CCO în mediul de testare. Se recomandă ca valorile COT în mediu (adică înainte de adăugarea algelor) să fie mai mici de 2 mg/l (7).

## ▼B

Când se testează substanțe cu conținut de metale, este important să se admită că proprietățile mediului de testare (de exemplu duritatea, capacitatea de chelatizare) ar putea să aibă legătură cu toxicitatea substanței studiate. De aceea, este de preferat un mediu bine caracterizat. Cu toate acestea, în prezent, singurele medii bine caracterizate care se cunosc ca fiind optime pentru cultura pe termen lung a *Daphnia magna* sunt Elendt M4 și M7. Ambele medii conțin agentul de chelatizare EDTA. Cercetările (2) arată că „toxicitatea aparentă” a cadmiului este în general mai mică atunci când testul de reproducere se realizează în mediile M4 și M7 decât în mediile cu conținut de EDTA. Prin urmare, M4 și M7 nu se recomandă pentru substanțele de probă ce conțin metale și, de asemenea, trebuie să se evite alte medii ce conțin agenți de chelatizare cunoscuți. Pentru substanțele cu conținut de metale, se poate recomanda utilizarea unui mediu alternativ, de exemplu apa dură proaspătă reconstituită conform ASTM (7), care nu conține EDTA, cu adaos de extract de plante de mare (8). Combinația menționată, de apă dură proaspătă reconstituită conform ASTM și extract de plante de mare, este potrivită și pentru cultura pe termen lung și testarea *Daphnia magna* (2), deși aceasta mai exercită o acțiune slabă de chelatizare datorită componentei organice din extractul de plante de mare adăugat.

La începutul și în timpul testului, concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 3 mg/l. pH-ul trebuie să aibă valori în domeniul 6-9 și, în mod normal, nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în oricare din încercări. Se recomandă o duritate mai mare de 140 mg/l (exprimată în  $\text{CaCO}_3$ ). Testele efectuate la această valoare și la valori mai mari au demonstrat o performanță a reproducerii conformă cu criteriile de validitate (9) (10).

#### 1.6.4. Soluțiile de testare

Soluțiile de testare de concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții mamă. Soluțiile mamă se prepară de preferință prin dizolvarea substanței în mediul experimental.

În unele cazuri, s-ar putea să fie necesară utilizarea solvenților organici sau a agenților de dispersie pentru a obține o soluție mamă de concentrația indicată, dar trebuie făcut tot posibilul pentru a se evita utilizarea acestor materiale. Ca solvenți potriviți se pot utiliza acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul. Exemple de agenți de dispersie potriviți sunt Cremophor RH40, metilceluloza 0,01 % și HCO-40. În orice caz, substanța testată în soluțiile experimentale nu trebuie să depășească limita de solubilitate în mediul de testare.

Se utilizează solvenți pentru a obține o soluție mamă care să se poată doza cu exactitate în apă. La concentrația recomandată a solventului în mediul de testare final (adică  $\leq 0,1$  ml/l), solvenții enumerați anterior nu sunt toxici și nu cresc solubilitatea în apă a unei substanțe.

Agenții de dispersie pot să faciliteze dozarea exactă și dispersia. La concentrația recomandată în mediul de testare final ( $\leq 0,1$  ml/l), agenții de dispersie enumerați anterior nu sunt toxici și nu cresc solubilitatea în apă a unei substanțe.

**▼B****1.7. PROTOCOLUL TESTULUI**

Tratamentele se repartizează tuturor vaselor experimentale și toată manipularea ulterioară a vaselor experimentale se face în mod aleatoriu. Nerespectarea acestui principiu poate să aducă prejudicii care pot fi interpretate ca fiind un efect al concentrației. În special, dacă unitățile experimentale sunt manipulate în ordinea tratamentului sau a concentrației, atunci unele efecte care depind de timp, cum ar fi oboseala operatorului sau altă eroare, ar putea să genereze efecte mai mari la concentrații mai mari. În plus, dacă există posibilitatea ca rezultatele testului să fie influențate de o condiție inițială sau de mediu a testului, cum ar fi poziția în laborator, atunci trebuie să se aibă în vedere oprirea testului.

**1.8. PROCEDURA DE TESTARE****1.8.1. Condiții de expunere****1.8.1.1. Durata**

Durata testului este de 21 de zile.

**1.8.1.2. Încărcarea**

Animalele părinți se țin individual, câte unul în fiecare vas experimental, care conține 50-100 ml mediu.

Uneori, s-ar putea să fie necesare volume mai mari pentru a satisface condițiile procedurii analitice utilizat pentru determinarea concentrației substanței testate, deși este permisă și unirea probelor duble pentru analiza chimică. Dacă se utilizează volume mai mari de 100 ml, s-ar putea ca rația furnizată pentru dafnia să fie crescută pentru a asigura o alimentație adecvată și respectarea criteriilor de validitate. Pentru testele în flux continuu, se pot avea în vedere, din motive tehnice, alte protocoale (de exemplu patru grupe de 10 animale într-un volum de mediu experimental mai mare), dar se specifică orice modificări ale protocolului testului.

**1.8.1.3. Numărul animalelor**

Pentru testele semistatice, cel puțin 10 animale ținute fiecare la fiecare concentrație experimentată și cel puțin 10 animale ținute fiecare în seria martor.

Pentru testele în flux continuu, s-a dovedit că sunt necesare 40 de animale împărțite în patru grupe de câte 10 animale pentru fiecare concentrație experimentată (1). Se pot utiliza mai puține organisme experimentale și se recomandă un minimum de 20 de animale per concentrație, împărțite în două sau mai multe probe identice cu un număr egal de animale (de exemplu patru probe identice, fiecare cu cinci daphnide). De reținut că pentru testele în care animalele sunt ținute în grupe, nu va fi posibilă exprimarea capacității de reproducere sub forma numărului total de progenituri vii produse per animal părinte în viață la sfârșitul testului, dacă animalele părinți mor. În aceste cazuri, capacitatea de reproducere se exprimă prin „numărul total de progenituri vii produse per părinte prezent la începutul testului”.

**1.8.1.4. Administrarea hranei**

Pentru testele semistatice, hrana se administrează de preferință zilnic, dar cel puțin de trei ori pe săptămână (adică să corespundă modificărilor mediilor). Se consemnează orice abatere de la această regulă (de exemplu pentru testele în flux continuu).

**▼B**

Pe durata testului, hrana animalelor părinți este alcătuită de preferință din celule de alge vii din una sau mai multe din următoarele specii: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* [acum *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] și *Scenedesmus subspicatus*. Regimul alimentar ia în considerație conținutul de carbon organic (C) administrat fiecărui animal părinte. Cercetările (12) au arătat că, pentru *Daphnia magna*, rațiile cuprinse între 0,1 și 0,2 mg C/dafnia/zi sunt suficiente pentru obținerea numărului necesar de progenituri care să satisfacă criteriile de validitate a testului. Rația se poate administra fie sub forma unei porții constante pe toată perioada testului sau, dacă se dorește, se administrează o porție mai mică la început și apoi se crește în timpul testului, ținând cont de creșterea animalelor părinți. În cazul menționat, rația tot trebuie să rămână între valorile recomandate de 0,1-0,2 mg C/dafnia/zi tot timpul.

Dacă urmează să se utilizeze măsuri înlocuitoare, de exemplu numărul de celule de alge sau absorbanta luminii, la administrarea rației (adică pentru ușurință, deoarece măsurarea conținutului de carbon durează mult), fiecare laborator trebuie să-și realizeze propria nomogramă referitoare la măsura înlocuitoare pentru conținutul de carbon al culturii de alge (a se vedea apendicele 2 pentru recomandarea privind realizarea nomogramei). Nomogramele se verifică cel puțin anual și mai frecvent, dacă au fost schimbate condițiile de cultură a algelor. S-a găsit că absorbanta luminii este un înlocuitor mai bun pentru conținutul de carbon decât numărul de celule (13).

Pentru a minimiza volumul mediului de cultură de alge transferat în vasele experimentale se administrează o suspensie de alge concentrată pentru dafnia. Concentrația de alge se poate obține prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată, apă deionizată sau mediu de cultură pentru dafnia.

#### 1.8.1.5. *Lumina*

16 ore de lumină la o intensitate de maximum  $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 1.8.1.6. *Temperatura*

Temperatura mediilor experimentale trebuie să fie cuprinsă între valorile 18 °C și 22 °C. Cu toate acestea, pentru niciun test, temperatura nu trebuie să varieze, dacă se poate, cu mai mult de 2 °C în limitele specificate (de exemplu 18-20, 19-21 sau 20-22 °C). S-ar putea să fie necesară utilizarea unui vas experimental suplimentar pentru urmărirea temperaturii.

#### 1.8.1.7. *Aerarea*

Vasele experimentale nu se aerează în timpul testului.

#### 1.8.2. **Concentrația experimentată**

În mod normal, trebuie să existe cel puțin cinci concentrații experimentate aranjate în serie geometrică cu un factor de separare de maximum 3,2 și trebuie să se utilizeze numărul optim de probe identice pentru fiecare concentrație experimentată (a se vedea punctul 1.8.1.3). Dacă se utilizează mai puțin de cinci concentrații, acest lucru se justifică. Substanțele nu se testează la concentrații mai mari decât limita de solubilitate a acestora în mediul experimental.

**▼B**

La stabilirea domeniului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

- (i) Dacă se urmărește obținerea CMEO/CFEO, cea mai mică concentrație experimentată trebuie să fie suficient de mică, astfel încât fecunditatea la această concentrație să nu fie cu mult mai mică decât aceea din martor. Dacă nu este așa, testul va trebui să fie repetat cu concentrația cea mai mică redusă.
- (ii) Dacă se urmărește obținerea CMEO/CFEO, cea mai mare concentrație experimentată trebuie să fie suficient de mare, astfel încât fecunditatea la această concentrație să fie cu mult mai mică decât aceea din martor. Dacă nu este așa, testul va trebui să fie repetat cu concentrația cea mai mare sporită.
- (iii) Dacă se determină  $CE_x$  pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă utilizarea unor concentrații suficiente pentru stabilirea  $CE_x$  cu un nivel corespunzător de siguranță. Dacă se determină  $CE_{50}$  pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă ca cea mai mare concentrație experimentată să fie mai mare decât  $CE_{50}$  menționat. În caz contrar, deși va fi posibilă încă determinarea  $CE_{50}$ , intervalul de siguranță pentru  $CE_{50}$  va fi foarte larg și s-ar putea să nu fie posibil să se aprecieze dacă modelul este cel indicat.
- (iv) Este de preferat ca valorile concentrației experimentate să nu includă concentrații care au efect important din punct de vedere statistic asupra supraviețuirii adulților, deoarece acest lucru ar modifica natura testului de la un test pur și simplu de reproducere la un test combinat de reproducere și mortalitate care necesită o analiză statistică mult mai complexă.

Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței testate (de exemplu dintr-un test de toxicitate acută și din studii de găsire a domeniului) ar fi utilă în selectarea concentrațiilor optime pentru test.

Dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru a facilita prepararea soluțiilor experimentale (a se vedea punctul 1.6.4), concentrația acestuia în vasele experimentale nu trebuie să fie mai mare de 0,1 ml/l și trebuie să fie aceeași în toate vasele.

### 1.8.3. Probele martor

În afară de seria pentru test, se mai realizează o serie de probe martor pentru mediul experimental și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de probe martor care conțin solventul sau agentul de dispersie. Dacă se utilizează, concentrația solventului sau agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele ce conțin substanța testată. Se utilizează numărul optim de probe identice (a se vedea punctul 1.8.1.3).

În general, într-un test bine realizat, coeficientul de variație în jurul numărului mediu de progenituri vii obținute per animal părinte în proba (probele) martor este  $\leq 25\%$  și acest lucru se consimțenează în protocoalele testului care utilizează animale ținute separat.

### 1.8.4. Reînnoirea mediului de testare

Frecvența reînnoirii mediului de testare depinde de stabilitatea substanței testate, dar trebuie să fie de cel puțin trei ori pe săptămână. Dacă, din testele preliminare de stabilitate (a se vedea punctul 1.4), concentrația substanței testate nu este stabilă (adică nu se încadrează în intervalul 80-120 %) din valoarea nominală sau este mai mică de 80 % din concentrația inițială măsurată) în perioada maximă de reînnoire (adică trei zile), trebuie să se aibă în vedere o reînnoire mai frecventă a mediului sau să se utilizeze un test în flux continuu.

**▼B**

Când un mediu este reînnoit în teste semistatice, se pregătește o a doua serie de vase experimentale și animalele părinți se transferă în acestea cu ajutorul, de exemplu, unei pipete de sticlă cu un diametru potrivit. Volumul mediului transferat cu dafnia trebuie să fie minim.

**1.8.5. Observații**

Rezultatele observațiilor făcute în timpul testului se consemnează în fișe tehnice (a se vedea exemple în apendicele 3 și 4). Dacă sunt necesare alte măsurători (a se vedea punctele 1.3 și 1.8.8), s-ar putea să fie necesare observații suplimentare.

**1.8.6. Progenituri**

Progeniturile produse de fiecare animal părinte se scot, de preferință, și se numără zilnic de la apariția primilor pui, pentru a preveni consumarea de către aceștia a hranei destinate adulților. În sensul prezentei metode, se numără doar numărul de progenituri vii, dar se consemnează și prezența ouălor avortate sau a progeniturilor decedate.

**1.8.7. Mortalitate**

Mortalitatea în rândul animalelor părinți se înregistrează de preferință zilnic, cel puțin de câte ori se numără progeniturile.

**1.8.8. Alți parametri**

Deși prezenta metodă este destinată în principal evaluării efectelor asupra reproducerii, este posibil să se poată măsura și alte efecte suficient pentru a permite o analiză statistică. Măsurătorile de creștere sunt de dorit în mare măsură, deoarece oferă date privind posibilele efecte subletale, care s-ar putea să fie mai utile decât determinarea doar a reproducerii; se recomandă măsurarea lungimii animalelor părinți (adică lungimea corpului, fără înotătoarea caudală, la sfârșitul testului. Alți parametri care se pot măsura sau calcula includ timpul de producere a primului pui (și a puilor ulteriori), numărul și dimensiunea puilor per animal, numărul de pui avortați, prezența masculilor sau ephippia și rata intrinsecă a creșterii populației.

**1.8.9. Frecvența determinărilor și măsurărilor analitice**

Este necesar să se măsoare concentrația oxigenului, temperatura, duritatea și valorile pH-ului cel puțin o dată pe săptămână, în mediile proaspete și cele vechi, în proba (probele) martor și în concentrațiile cele mai mari de substanță testată.

În timpul testului, se determină concentrația substanței testate la intervale regulate.

În testele semistatice, unde se estimează o menținere a concentrației substanței testate în limitele de  $\pm 20\%$  din cea nominală (adică în intervalul de 80-120 % – a se vedea punctele 1.4 și 1.8.4), se recomandă analizarea cel puțin a celei mai mari și a celei mai mici concentrații experimentate, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și când sunt reînnoite în timpul primei săptămâni de testare (adică analizele se realizează pe o probă din aceeași soluție – atunci când este proaspăt preparată și la reînnoire). Ulterior, determinările respective se repetă la intervale de cel puțin o săptămână.

**▼B**

Pentru testele în care nu se estimează menținerea concentrației substanței testate în limitele de  $\pm 20\%$  din cea nominală, este necesară analizarea tuturor concentrațiilor experimentate, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și la reînnoire. Cu toate acestea, pentru acele teste în care concentrația inițială măsurată a substanței testate nu se situează în limitele de  $\pm 20\%$  din cea nominală, dar se pot aduce dovezi care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (adică în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinarea chimică se poate reduce în săptămânile 2 și 3 de testare la cea mai mare și cea mai mică concentrație experimentată. În toate cazurile, este necesar să se determine concentrațiile substanței testate înaintea reînnoirii doar la un vas din cele identice pentru fiecare concentrație experimentată.

Dacă se utilizează un test cu flux continuu, se recomandă un regim de prelevare a probelor similar cu cel descris pentru testele semistatice (dar măsurarea soluțiilor „vechi” nu se aplică în acest caz). Cu toate acestea, ar putea fi recomandabil să se crească numărul prelevărilor de probe în prima săptămână (de exemplu trei seturi de măsurători) pentru a asigura menținerea stabilității concentrațiilor experimentale. La aceste tipuri de testări, trebuie verificat zilnic fluxul diluantului și al substanței testate.

Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței testate în limitele de  $\pm 20\%$  din cea nominală sau măsurată inițial, atunci rezultatele se pot obține din valoarea nominală sau din cea măsurată inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial este mai mare de  $\pm 20\%$ , este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media ponderată în timp (a se vedea appendicele 5).

## 2. DATE ȘI RAPORT

### 2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Scopul prezentului test îl constituie determinarea efectului substanței testate asupra numărului total de progenituri vii produse per animal părinte în viață la sfârșitul testului. Numărul total de progenituri per animal părinte se calculează pentru fiecare vas experimental (adică proba repetată). Dacă, în fiecare probă repetată, animalul părinte moare în timpul testului sau se dovedește a fi mascul, atunci proba repetată se exclude din analiză. Analiza se va face atunci pentru un număr redus de probe identice.

Pentru estimarea CME0 și, prin urmare, a CFEO, pentru efectele substanței chimice asupra capacității de reproducere, este necesar să se calculeze capacitatea medie de reproducere pentru toate probele identice pentru fiecare concentrație și deviație standard remanentă comună și acest lucru se poate realiza prin analiza de varianță (ANOVA). Apoi, media pentru fiecare concentrație se compară cu media probelor martor, utilizând o metodă potrivită de comparare multiplă. Ar putea să fie utile testele Dunnett sau Williams (14) (15) (16) (17). Este necesar să se verifice dacă estimarea ANOVA de varianță uniformă este valabilă. Se recomandă ca acest lucru să se facă mai degrabă grafic decât printr-un test de importanță oficială (18); o variantă potrivită este efectuarea unui test Barlett. Dacă această estimare (ANOVA) nu este valabilă, atunci ar trebui să se aibă în vedere transformarea datelor pentru a omogeniza varianțele înaintea efectuării ANOVA sau efectuarea unei ANOVA ponderate. Se calculează și se prezintă dimensiunea efectului detectabil prin utilizarea ANOVA (adică diferența cea mai puțin importantă).

**▼B**

Pentru estimarea concentrației care ar putea să genereze o reducere de 50 % a capacității de reproducere (adică  $CE_{50}$ ), trebuie să se realizeze o reprezentare grafică corespunzătoare a datelor, de exemplu printr-o curbă logaritmică, utilizând o metodă statistică cum ar fi metoda celor mai mici pătrate. Curba ar putea să fie bine caracterizată în funcție de parametri, astfel încât să se poată determina direct  $CE_{50}$  și eroarea sa standard. Aceasta ar ușura mult calcularea limitelor de încredere pentru  $CE_{50}$ . Cu excepția cazului în care există motive întemeiate să se prefere limite de încredere diferite, se fixează limite de încredere de 95 % de ambele părți. Este preferabil ca procedeul de trasare a curbei să ofere un mijloc pentru evaluarea semnificației ajustării incomplete. Acest lucru se poate realiza grafic sau prin împărțirea sumei remanente de pătrate în „ajustare incompletă” și „componente de eroare pură” și prin efectuarea unui test de importanță pentru ajustarea incompletă. Deoarece există posibilitatea ca tratamentele care dau o fecunditate mare să aibă o varianță mai mare a numărului de animale tinere produse decât tratamentele care dau o fecunditate mică, trebuie să se aibă în vedere ponderarea valorilor observate pentru a reflecta varianțele diferite din grupele tratate diferit [a se vedea referința bibliografică (18) pentru date de bază].

Din analiza datelor din testul final de intercalibrare (2), s-a trasat o curbă logaritmică cu ajutorul modelului prezentat în continuare, deși se pot utiliza și alte modele:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

unde:

Y = numărul total de animale tinere per animal părinte în viață la sfârșitul testului (calculat pentru fiecare vas)

x = concentrația substanței

c = numărul preconizat de animale tinere atunci când x = 0

$x_0$  =  $CE_{50}$  în populație

b = panta curbei

Se pare că acest model este adecvat unui număr mare de situații, dar există teste pentru care nu este potrivit. Este necesară verificarea validității modelului recomandat anterior. În unele cazuri, se poate să fie potrivit modelul hormetic, în care concentrațiile mici generează efecte sporite (19).

Se mai pot estima și alte concentrații de efect, de exemplu  $CE_{10}$  sau  $CE_{20}$ , deși ar fi preferabil să se utilizeze o caracterizare în funcție de parametri a modelului diferită de cea utilizată la determinarea  $CE_{50}$ .

## 2.2. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă următoarele:

### 2.2.1. Substanța testată:

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;



**▼B**

- date de identificare chimică, inclusiv puritatea.

**2.2.2. Speciile experimentale:**

- clonul (dacă a fost caracterizat genetic, astfel încât să corespundă speciei), furnizorul sau sursa (dacă se cunoaște) și condițiile de cultură utilizate. Dacă se utilizează o specie diferită de *Daphnia magna*, acest lucru se consemnează și se justifică.

**2.2.3. Condițiile de testare:**

- modul de lucru utilizat (de exemplu semistatic sau în flux continuu, volumul, încărcarea în număr de dafnia pe litru);
- timpul de expunere la lumină și intensitatea luminii;
- protocolul testului (de exemplu numărul de probe identice, numărul de părinți pentru fiecare probă repetată);
- detalii privind mediul de cultură utilizat;
- adaosurile de material organic, dacă se practică, inclusiv compoziția, sursa, metoda de preparare, raportul COT/CCO al amestecurilor preparate, determinarea raportului COT/CCO rezultat în mediul experimental;
- date detaliate privind hrana, inclusiv cantitatea (în mg C/dafnia/zi) și programul (de exemplu tipul hranei, care include pentru alge denumirea specifică (specia) și, dacă se cunoaște, familia, condițiile de cultură);
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (dacă se utilizează un solvent sau agent de dispersie, concentrația acestora).

**2.2.4. Rezultatele:**

- rezultatele oricăror studii preliminare privind stabilitatea substanței testate;
- concentrațiile nominale experimentate și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasele experimentale (a se vedea fișele tehnice din apendicele 4); de asemenea, se prezintă eficiența de regenerare a metodei și limita determinării;
- calitatea apei din vasele experimentale (adică pH, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat, COT și CCO și duritatea, dacă este cazul (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 3));
- fișa completă cu progeniturile vii pentru fiecare animal părinte (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 3);
- numărul de decese printre animalele părinți și ziua în care au avut loc (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 3);
- coeficientul de variație pentru fecunditatea matorului (pe baza numărului total de progenituri vii per animal părinte în viață la sfârșitul testului);
- reprezentarea grafică a numărului total de progenituri vii per animal părinte (pentru fiecare probă identică) în viață la sfârșitul testului în funcție de concentrația substanței testate;
- concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) pentru reproducere, care include o descriere a metodelor statistice utilizate și indicarea dimensiunii efectului care ar putea să fie detectat și concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO) pentru reproducere; dacă este cazul, se consemnează și raportul CMEO/CFEO pentru mortalitatea animalelor părinți;

**▼B**

- dacă este cazul,  $CE_x$  pentru reproducere cu intervalele de încredere și reprezentarea grafică a modelului utilizat pentru calculul acesteia, panta curbei doză-răspuns și erorile standard ale acesteia;
- alte efecte biologice observate sau măsurători: se consemnează orice alte efecte biologice care au fost observate sau măsurate (de exemplu, creșterea animalelor părinți), inclusiv o justificare corespunzătoare;
- explicarea oricărei abateri de la modul de lucru.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
2. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
3. Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, p. 257-265.
4. Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, p. 25-33.
5. EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
6. Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, p. 775-782.
7. ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. p. 20.
8. Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) p. 144-148.
9. Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26, p. 1-8.
10. Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2), p. 185-196.
11. Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, p. 209.
12. Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, p. 2053-2058.

**▼B**

13. Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, p. 459-466.
14. Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, p. 1096-1121.
15. Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, p. 482-491.
16. Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, p. 103-117.
17. Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, p. 510-531.
18. Draper N. R. and Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, N.Y.
19. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, p. 93-96.
20. Wilson E. O. and Bossert, W.H. (1971). *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers.
21. Poole R. W. (1974). *An Introduction to quantitative Ecology*. McGraw Hill Series in Population Biology, New York, p. 532.
22. Meyer J. S., Ingersoll C.G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology*, 67, p. 1156-1166.



### Apendicele 1

## PREPARAREA MEDIILOR ELENDET M7 ȘI M4 COMPLET DETERMINATE

### Adaptarea la mediile Elendt M7 și M4

Unele laboratoare au întâmpinat dificultăți la transferul direct al dafniei în mediile M4 (1) și M7. Cu toate acestea, s-au obținut unele succese în adaptarea treptată, adică transferul din mediul propriu în 30 % Elendt, apoi 60 % Elendt și apoi în 100 % Elendt. Perioadele de adaptare pot să fie de o lună.

### PREPARAREA

#### Microelementele

Se prepară mai întâi soluții mamă separate (I) ale fiecărui microelement în apă de puritate corespunzătoare, de exemplu deionizată, distilată sau purificată prin osmoză inversă. Din soluțiile mamă menționate (I), se prepară o soluție mamă unică (II), care conține toate microelementele (soluție combinată), adică:

| Soluțiile mamă I<br>(o singură substanță)             | Cantitatea adăugată în apă<br>(mg/l) | Concentrația (în funcție de<br>mediul M4)<br>(multiplu) | Pentru prepararea soluției mamă combinate II,<br>se adaugă următoarea cantitate de soluție mamă<br>I în apă<br>(ml/l) |      |
|---|--------------------------------------|---|---|------|
|   |                                      |   | M4  | M7   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 57 190                               | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                | 7 210                                | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| LiCl  | 6 120                                | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| RbCl  | 1 420                                | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 3 040                                | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| NaBr  | 320                                  | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 1 260                                | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 335                                  | 20 000  | 1,0   | 0,25 |
| ZnCl <sub>2</sub>                                     | 260                                  | 20 000  | 1,0   | 1,0  |
| CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 200                                  | 20 000  | 1,0   | 1,0  |
| KI  | 65                                   | 20 000  | 1,0   | 1,0  |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                      | 43,8                                 | 20 000  | 1,0   | 1,0  |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>                       | 11,5                                 | 20 000  | 1,0   | 1,0  |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | 5 000                                | 2 000   | —   | —    |
| Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O               | 1 991                                | 2 000   | —   | —    |

Atât soluțiile de Na<sub>2</sub>EDTA cât și de FeSO<sub>4</sub> se prepară separat, se toarnă împreună și se autoclavează imediat.  
Rezultă:

|                    |  |       |      |     |
|--------------------|--|-------|------|-----|
| soluția 21 Fe-EDTA |  | 1 000 | 20,0 | 5,0 |
|--------------------|--|-------|------|-----|

**▼B****Mediile M4 și M7**

Mediile M4 și M7 se prepară din soluția mamă II, macroelemente nutritive și vitamine, după cum urmează:

|  | Cantitatea adăugată în apă (mg/l) | Concentrația (în funcție de mediul M4) (multiplu) | Cantitatea de soluție mamă adăugată pentru prepararea mediului (ml/l) |    |
|--|-----------------------------------|---|---|----|
|  |                                   |   | M4  | M7 |
| Microelementele combinate în soluția mamă II |                                   | 20  | 50  | 50 |

Soluțiile mamă cu macroelemente nutritive (o singură substanță)

|  |         |        |     |     |
|--|---------|--------|-----|-----|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$           | 293 800 | 1 000  | 1,0 | 1,0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$           | 246 600 | 2 000  | 0,5 | 0,5 |
| KCl  | 58 000  | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $\text{NaHCO}_3$                                     | 64 800  | 1 000  | 1,0 | 1,0 |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ | 50 000  | 5 000  | 0,2 | 0,2 |
| $\text{NaNO}_3$                                      | 2 740   | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1 430   | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                             | 1 840   | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| Soluție combinată de vitamine                        | —       | 10 000 | 0,1 | 0,1 |

Soluția mamă combinată de vitamine se prepară prin adăugarea celor 3 vitamine la 1 litru de apă conform indicațiilor prezentate în continuare.

|                                     |     |        |   |   |
|-------------------------------------|-----|--------|---|---|
| Clorhidrat de tiamină               | 750 | 10 000 | — | — |
| Cianocobalamină ( $\text{B}_{12}$ ) | 10  | 10 000 | — | — |
| Biotină                             | 7,5 | 10 000 | — | — |

Soluția combinată de vitamine se păstrează înghețată în mici alicoji. Vitaminele se adaugă în medii cu puțin timp înaintea utilizării.

Note: Pentru a evita precipitarea sărurilor în timpul preparării mediilor complete, se adaugă alicoji de soluții mamă în aproximativ 500-800 ml apă deionizată și apoi se aduce la un litru.

Prima semnalare a mediului M4 se poate găsi în Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, p. 25-33.

## ▼B

## Apendicele 2

### ANALIZA CONȚINUTULUI DE CARBON ORGANIC TOTAL (COT) ȘI REALIZAREA UNEI NOMOGRAME PENTRU CONȚINUTUL COT DIN HRANA PE BAZĂ DE ALGE

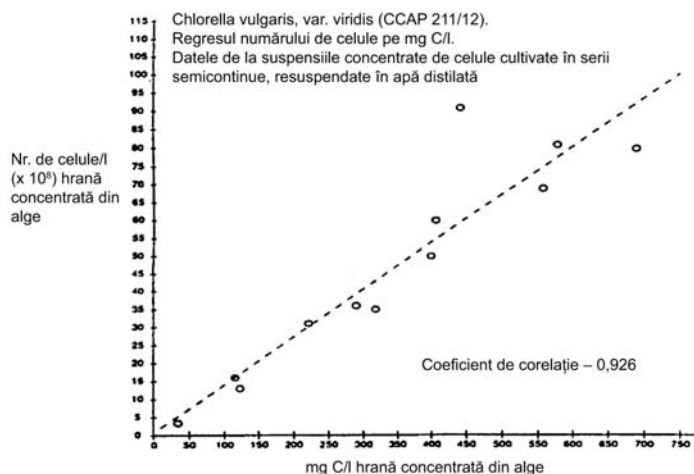
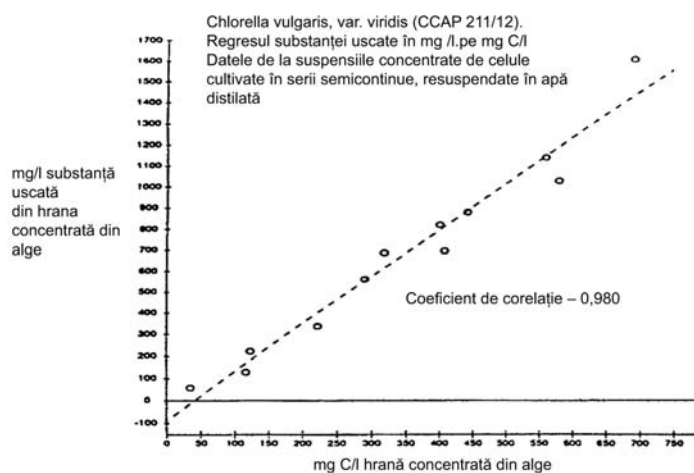
Se acceptă ca măsurarea conținutului de carbon din hrana pe bază de alge să nu se măsoare în mod normal direct, ci din corelările (adică nomogramele) cu măsurile înlocuitoare, de exemplu numărul celulelor de alge sau absorbanta luminii).

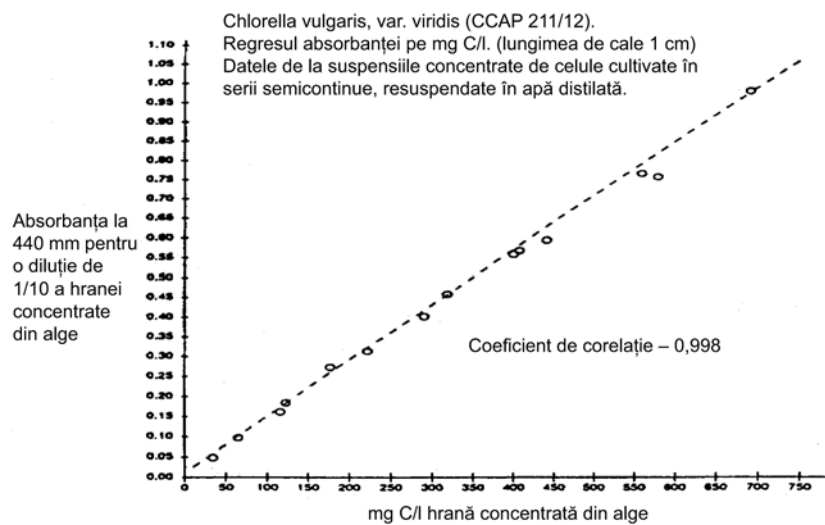
Este necesar ca măsurarea COT să se efectueze mai degrabă prin oxidare la temperatură mare decât prin metodele UV sau cu persulfat. (A se vedea The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pentru obținerea nomogramelor, algele se separă din mediul de cultură prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată. Se determină parametrul înlocuitor și concentrația COT în fiecare probă de trei ori. Se analizează probele oarbe în apă distilată și concentrația COT se scade din concentrația COT din proba de alge.

Nomogramele trebuie să fie liniare în domeniul necesar de concentrații ale carbonului. Exemplele sunt prezentate în continuare.

NB: Nomogramele nu se utilizează pentru conversiune; este esențial ca laboratoarele să-și elaboreze propriile nomograme.



**▼ B**

## Apendicele 3

**EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA REÎNNOIRII MEDIULUI, DATELE CONTROLULUI FIZIC/CHIMIC, ADMINISTRAREA HRANEI, REPRODUCEREA DAFNIEI ȘI MORTALITATEA ADULȚILOR**

| Nr. experiment:                                 | Început la data: |   |   |   |   | Conul: |   |   |   |   | Mediul: |    |    |    |    | Tipul hranei: |    |    |    |    | Substanța testată: |    |       |       |  | Conc. nominală: |  |
|---|------------------|---|---|---|---|--------|---|---|---|---|---------|----|----|----|----|---------------|----|----|----|----|--------------------|----|-------|-------|--|-----------------|--|
| Ziua  | 0                | 1 | 2 | 3 | 4 | 5      | 6 | 7 | 8 | 9 | 10      | 11 | 12 | 13 | 14 | 15            | 16 | 17 | 18 | 19 | 20                 | 21 |       |       |  |                 |  |
| Reînnoirea mediului (se bifează)                |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| PH <sup>(1)</sup>                               |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | nou   |       |  |                 |  |
|   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | vechi |       |  |                 |  |
| O <sub>2</sub> (mg/l) <sup>(1)</sup>            |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | nou   |       |  |                 |  |
|   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | vechi |       |  |                 |  |
| Temperatura (°C) <sup>(1)</sup>                 |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | nou   |       |  |                 |  |
|   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    | vechi |       |  |                 |  |
| Hrana administrată (se bifează)                 |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| Nr. progenituri vii (se bifează) <sup>(2)</sup> |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       | Total |  |                 |  |
| Vasul 1   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| 2   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| 3   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| 4   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |
| 5   |                  |   |   |   |   |        |   |   |   |   |         |    |    |    |    |               |    |    |    |    |                    |    |       |       |  |                 |  |



## ▼B

| Nr. experiment:                                    |   | Început la data: |   |   |   | Conul: |   |   |   | Mediul: |    |    |    | Tipul hranei: |    |    |    | Substanța testată: |    |    |    | Conc. nominală: |       |  |  |
|--|---|------------------|---|---|---|--------|---|---|---|---------|----|----|----|---------------|----|----|----|--------------------|----|----|----|-----------------|-------|--|--|
| Ziua   | 0 | 1                | 2 | 3 | 4 | 5      | 6 | 7 | 8 | 9       | 10 | 11 | 12 | 13            | 14 | 15 | 16 | 17                 | 18 | 19 | 20 | 21              |       |  |  |
| 6  |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |
| 7  |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |
| 8  |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |
| 9  |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |
| 10   |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |
|  |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 | Total |  |  |
| Mortalitatea cumulativă a adulților <sup>(3)</sup> |   |                  |   |   |   |        |   |   |   |         |    |    |    |               |    |    |    |                    |    |    |    |                 |       |  |  |

<sup>(1)</sup> Se indică vasul care s-a utilizat pentru experimentare.

<sup>(2)</sup> Mortalitatea animalelor adulte se consemnează cu „M” în căsuța respectivă.

<sup>(3)</sup> Puii avortați se consemnează cu „AV” în căsuța respectivă.



*Apendicele 4*

**EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA REZULTATELOR ANALIZEI CHIMICE**

(a) **Concentrațiile măsurate**

| Conc. nominală | Proba din săptămâna 1 |       | Proba din săptămâna 2 |       | Proba din săptămâna 3 |       |
|----------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
|                | Proaspătă             | Veche | Proaspătă             | Veche | Proaspătă             | Veche |
|                |                       |       |                       |       |                       |       |

(b) **Concentrațiile măsurate sub formă de procente din cea nominală**

| Conc. nominală | Proba din săptămâna 1 |       | Proba din săptămâna 2 |       | Proba din săptămâna 3 |       |
|----------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
|                | Proaspătă             | Veche | Proaspătă             | Veche | Proaspătă             | Veche |
|                |                       |       |                       |       |                       |       |

▼ B

## Apendicele 5

## CALCULAREA MEDIEI PONDERATE DE TIMP

## Media ponderată de timp

Deoarece concentrația substanței testate poate să scadă în intervalul de timp dintre reînnoiri, este necesar să se aibă în vedere necesitatea alegerii unei concentrații reprezentative pentru domeniul de concentrații experimentate cu dafnia părinți. Alegerea se face pe principii atât biologice, cât și statistice. De exemplu, dacă se consideră că reproducerea este afectată cel mai mult de concentrația de vârf experimentată, atunci trebuie să se utilizeze concentrația maximă. Cu toate acestea, dacă se consideră că efectul acumulat sau pe termen lung al substanței toxice este mai important, atunci o concentrație medie este mai relevantă. În cazul respectiv, o medie potrivită pentru utilizare este concentrația medie ponderată de timp, deoarece ține seama de variația concentrației instantanee în timp.

Figura 1

## Exemplu de medie ponderată de timp

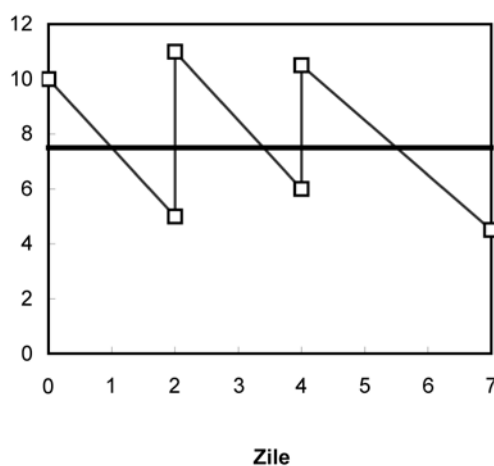


Figura 1 prezintă un exemplu de test (simplificat) cu durata de șapte zile cu reînnoirea mediului în zilele 0, 2 și 4.

— Linia subțire în zig-zag reprezintă concentrația în orice punct în timp. Se consideră că scăderea concentrației este urmarea unui proces de descompunere exponențială.

— Cele șase puncte reprezentate grafic arată concentrațiile observate, măsurate la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

— Linia continuă groasă indică poziția mediei ponderate de timp.

Media ponderată de timp se calculează, astfel încât aria de sub media ponderată de timp să fie egală cu aria de sub curba concentrațiilor. Calculul pentru exemplul anterior se prezintă în tabelul 1.



Tabelul 1

## Calculul mediei ponderate de timp

| Reînnoirea nr. | Zile | Conc0  | Conc1 | Ln(Conc0) | Ln(Conc1)   | Aria   |
|----------------|------|--------|-------|-----------|-------------|--------|
| 1              | 2    | 10,000 | 4,493 | 2,303     | 1,503       | 13,767 |
| 2              | 2    | 11,000 | 6,037 | 2,398     | 1,798       | 16,544 |
| 3              | 3    | 10,000 | 4,066 | 2,303     | 1,403       | 19,781 |
| Total zile: 7  |      |        |       |           | Aria totală | 50,091 |
|                |      |        |       |           | Media PT    | 7,156  |

„Zile” este numărul de zile din perioada de reînnoire.

„Conc0” este concentrația măsurată la începutul fiecărei perioade de reînnoire.

„Conc1” este concentrația măsurată la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

„Ln(Conc0)” este logaritmul natural al Conc0.

„Ln(Conc1)” este logaritmul natural al Conc1.

„Aria” este aria de sub curba exponențială pentru fiecare perioadă de reînnoire. Se calculează cu:

$$\text{Aria} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{Zile}$$

Media ponderată de timp („media PT”) este „Aria totală” împărțită la „Total zile”.

Desigur, pentru testul de reproducere a dafniei, tabelul trebuie mărit până la 21 de zile.

Este clar că atunci când observațiile se fac numai la începutul și sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, nu se poate confirma că procesul de descompunere este, de fapt, exponențial. O curbă diferită ar genera un calcul diferit pentru „Arie”. Cu toate acestea, un proces de descompunere exponențială nu este neverosimil și este probabil cea mai bună curbă de utilizat în absența altor date.

Cu toate acestea, este necesar să se procedeze cu prudență, dacă la analiza chimică nu se reușește să se găsească nicio substanță la sfârșitul perioadei I de reînnoire. Cu excepția cazului în care este posibil să se estimeze rapiditatea dispariției substanței din soluție, este imposibil să se obțină o arie realistă sub curbă și, prin urmare, este imposibil să se obțină o medie ponderată de timp rezonabilă.

**▼B****C.21. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A AZOTULUI****1. METODĂ**

Această metodă de testare reia Orientarea 216 (2000) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Această metodă de testare constă dintr-o metodă de laborator elaborată pentru studierea efectelor pe termen lung ale substanțelor chimice, după o singură expunere, asupra activității de transformare a azotului de către microorganismele din sol. Testul se bazează în principal pe recomandările emise de Organizația Europeană și Mediteraneană pentru Protecția Plantelor (1). Cu toate acestea, au fost avute în vedere și alte linii directe, inclusiv cele emise de Biologische Bundesanstalt din Germania (2), de Agenția pentru protecția mediului a Statelor Unite (3) din cadrul SETAC (4) și de Organizația Internațională de Standardizare (ISO) (5). Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (6). Recomandările privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol au la bază liniile directe ISO (7) și recomandările atelierului de la Belgirate. Pentru determinarea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor de testat este posibil să fie necesară determinarea efectelor acestora asupra activității microbiene din sol, de exemplu dacă sunt necesare date privind potențialele efecte secundare ale produselor fitosanitare asupra microflorei din sol sau în cazul riscurilor de expunere a microorganismelor din sol la alte substanțe chimice decât cele din produsele fitosanitare. Testul de transformare a azotului se efectuează pentru a determina efectele acestor substanțe chimice asupra microflorei din sol. Dacă se testează produse agrochimice (de exemplu produse fitosanitare, îngrășăminte, produse chimice de uz silvic) se efectuează atât testul de transformare a azotului cât și testul de transformare a carbonului. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice este suficient testul de transformare a azotului. Cu toate acestea, dacă valorile  $CE_{50}$  obținute în cadrul testului de transformare a azotului pentru substanțele în cauză se încadrează în intervalul de valori caracteristice inhibitorilor de nitrificare disponibili comercial (de exemplu nitrapirin), se poate efectua și un test de transformare a carbonului în vederea obținerii de informații suplimentare.

Solurile sunt formate din componente vii și din componente non-vii care formează amestecuri complexe și eterogene. Microorganismele joacă un rol important în descompunerea și transformarea materiei organice în sol fertil, multe specii aducându-și contribuția la diferitele aspecte ale fertilizării solurilor. Orice interferență pe termen lung în aceste procese biochimice riscă să perturbe ciclul elementelor nutritive și, în consecință, să altereze fertilitatea solului. Deși coloniile microbiene care determină aceste procese diferă de la un sol la altul, căile de transformare sunt în mare aceleași.

Prezenta metodă de testare descrisă a fost elaborată în vederea detectării efectelor adverse pe termen lung ale unei substanțe asupra procesului de transformare a azotului asupra solurilor aerobe de suprafață. Metoda de test permite și estimarea efectelor substanțelor asupra transformării carbonului de către microflora din sol. Nitratul se formează ca urmare a degradării legăturilor carbon-azot. De aceea, dacă ratele de producere a azotatului pentru solurile tratate și pentru solurile martor sunt identice, este foarte probabil ca principalele căi de degradare a carbonului să fie intacte și funcționale. Raportul carbon-azot din substratul ales pentru test (praf de făină de lucernă) este adecvat (în general între 12/1 și 16/1). Astfel, carențele de carbon sunt reduse pe parcursul testului, iar în cazul în care comunitățile microbiene sunt afectate de o substanță chimică, ele se pot refăce în termen de 100 de zile.

**▼B**

Testele pe baza cărora a fost elaborată această metodă de testare au fost concepute în primul rând pentru cazurile în care cantitatea de substanță care pătrunde în sol poate fi estimată. Este, de exemplu, cazul produselor fitosanitare a căror doză de aplicare pe sol este cunoscută. Pentru produsele agrochimice este suficient un test cu două doze reprezentative pentru aplicarea pe sol anticipată sau estimată. Produsele agrochimice pot fi testate ca principii active (p.a.) sau ca produse preparate. Cu toate acestea, testul nu se limitează la produse agrochimice. Modificând atât cantitatea de substanță de testat aplicată pe sol, cât și modul de evaluare a datelor, testul poate fi utilizat și pentru cazurile în care nu se cunoaște cantitatea de substanță care pătrunde în sol. Astfel, în cazul altor substanțe chimice decât cele din produsele agrochimice, se determină efectele unei serii de concentrații asupra transformării azotului. Datele obținute în cadrul acestor teste se folosesc pentru trasarea curbei doză-efect și pentru calcularea valorilor  $CE_x$  unde  $x$  se definește ca fiind efectul procentual.

## 1.2. DEFINIȚII

**Transformare a azotului:** degradarea finală a materiei organice care conține azot de către microorganisme prin procesele de amonificare și de nitrificare până la produsul final, nitratul anorganic.

**$CE_x$  (Concentrația efectivă):** este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu  $x$  la sută transformarea azotului în nitrat.

**$CE_{50}$  (Concentrația mediană efectivă):** este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu 50 la sută (50 %) transformarea azotului în nitrat.

## 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

## 1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se adaugă praf de făină vegetală în solul cernut, iar apoi fie se tratează cu substanța de testat, fie se lasă netratat (martor). Dacă testul vizează produse agrochimice, se recomandă utilizarea a cel puțin două concentrații, care trebuie alese în funcție de concentrația maximă previzibilă de pe teren. După 0, 7, 14 zile și după 28 de zile de incubare, probele de sol tratate și probele martor sunt supuse extracției cu un solvent adecvat și se determină cantitățile de nitrat din extrase. Rata de formare a nitratului pentru probele tratate se compară cu cea a probelor martor și se calculează deviația procentuală dintre probele tratate și probele martor. Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă în a 28-a zi diferențele dintre solurile tratate și cele netratate sunt mai mari sau egale cu 25 %, se continuă măsurătorile timp de cel mult 100 de zile. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, în probele de sol se adaugă o serie de concentrații ale substanței de testat și se măsoară cantitățile de nitrat formate după 28 de zile de incubare. Rezultatele testelor cu mai multe concentrații se analizează cu ajutorul unui model bazat pe regresie și se calculează valorile  $CE_x$  (de exemplu  $CE_{50}$ ,  $CE_{25}$  și/sau  $CE_{10}$ ). A se vedea definițiile.

## 1.5. VALABILITATEA TESTULUI

Evaluarea rezultatelor testelor efectuate asupra produselor agrochimice se bazează pe diferențe relativ mici (adică valori medii de  $\pm 25$  %) dintre concentrațiile de nitrat din probele martor și din probele de sol tratate, fapt care poate determina obținerea unor rezultate false dacă există variații mari între probele martor. De aceea variațiile dintre probele martor trebuie să fie mai mici de  $\pm 15$  %.

**▼B****1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Aparatură**

Se folosesc recipiente de testare confecționate din materiale inerte din punct de vedere chimic. Aceste recipiente trebuie să aibă o capacitate adecvată procedurii de incubare a solului utilizate, de exemplu incubare în vrac sau sub forma unei serii de probe individuale (a se vedea punctul 1.7.1.2). Pierderile de apă trebuie reduse la minimum și trebuie să se poată realiza schimbul de gaze (de exemplu, recipientele de testare se pot acoperi cu folie perforată de polietilenă). Dacă se testează substanțe volatile, se folosesc recipiente ermetice și etanșe la gaz. Dimensiunea recipientelor se alege astfel încât numai un sfert din volumul acestora să fie ocupat de proba de sol.

Se folosește echipament standard de laborator, inclusiv următoarele articole:

- agitator: dispozitiv mecanic de amestecare sau echipament echivalent;
- centrifugă (3 000 g) sau dispozitiv de filtrare (cu hârtie de filtru fără nitrați);
- instrument pentru analiza nitraților cu sensibilitate și reproductibilitate adecvată.

**1.6.2. Selectarea solurilor și numărul acestora**

Se folosește un singur sol. Caracteristicile recomandate ale acestuia sunt următoarele:

- conținut de nisip: cel puțin 50 % dar nu mai mult de 75 %;
- pH: 5,5-7,5;
- conținut de carbon organic: 0,5-1,5 %;
- se măsoară biomasa microbiană (8) (9), al cărei conținut de carbon trebuie să reprezinte cel puțin 1 % din carbonul organic total din sol.

În majoritatea cazurilor, un sol cu caracteristicile descrise anterior reprezintă cele mai nefavorabile condiții posibil, deoarece adsorbția substanței de testat este minimă, iar expunerea acesteia la microfloră este maximă. De aceea în general nu este necesar să se efectueze teste pe alte soluri. Cu toate acestea, în anumite situații, dacă principala utilizare preconizată a substanței de testat vizează în special soluri forestiere acide, sau în cazul substanțelor chimice cu sarcină electrostatică, poate fi necesară utilizarea unui sol suplimentar.

**▼B****1.6.3. Prelevarea și depozitarea probelor de sol****1.6.3.1. Prelevare**

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale. Locul ales pentru prelevarea solului trebuie să poată fi utilizat pe termen lung. Pășunile permanente, câmpurile plantate cu cereale anuale (cu excepția porumbului) sau semănături dese cu îngrășăminte vegetale sunt adecvate în acest sens. Locul de prelevare selectat trebuie să nu fi fost tratat cu produse fitosanitare timp de cel puțin un an înainte de prelevarea probelor. De asemenea, trebuie să nu fi fost aplicat niciun îngrășământ organic cel puțin pe parcursul ultimelor șase luni. Utilizarea îngrășămintelor minerale este acceptabilă numai dacă respectă cerințele de cultivare și dacă nu se prelevează probe de sol mai repede de trei luni de la aplicarea îngrășământului. Trebuie evitată utilizarea unor soluri tratate cu îngrășăminte cu efecte biocide cunoscute (de exemplu, cianamidă de calciu).

Se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (de peste 30 de zile) de secetă sau de saturare cu apă. În cazul solurilor arate, probele se recoltează de la o adâncime situată între 0 și 20 cm. În cazul pășunilor sau al altor soluri care nu sunt arate pe parcursul unor perioade lungi (cel puțin pe parcursul unei perioade de creștere), adâncimea maximă de prelevare poate fi puțin mai mare de 20 cm (de exemplu, 25 cm).

Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură de natură să garanteze că proprietățile inițiale ale solului nu se modifică în mod semnificativ.

**1.6.3.2. Depozitare**

Este preferabil ca solurile utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren. Dacă nu se poate evita depozitarea în laborator, solurile se depozitează la întuneric, la temperaturi de  $4 \pm 2$  °C timp de maximum trei luni. Pe parcursul depozitării solurilor trebuie asigurate condiții aerobe. Dacă solurile sunt prelevate dintr-o zonă în care sunt afectate de îngheț timp de cel puțin trei luni pe an, se poate avea în vedere depozitarea acestora timp de șase luni la temperaturi între minus 18 °C și minus 22 °C. Biomasa microbiană a solurilor depozitate se măsoară înaintea fiecărui experiment, iar conținutul de carbon din biomasă trebuie să fie de cel puțin 1 % din conținutul total de carbon organic al solului (a se vedea punctul 1.6.2).

**1.6.4. Manipularea și pregătirea solului pentru test****1.6.4.1. Preincubarea**

Dacă solul a fost depozitat (a se vedea punctul 1.6.3.2), se recomandă preincubarea timp de 2 până la 28 de zile. Temperatura și conținutul de umiditate al solului din perioada de pre-incubare trebuie să fie similare cu cele din cadrul testului (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3).



**▼B****1.6.4.2. Proprietăți fizice și chimice**

Se curăță manual solul de obiectele mari (de exemplu pietre, resturi vegetale etc.) apoi se cerne umed fără uscare excesivă pentru a se obține particule cu o dimensiune mai mică sau egală cu 2 mm. Conținutul de apă al probei de sol se ajustează cu apă distilată sau deionizată până la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei.

**1.6.4.3. Adăugarea cu substrat organic**

Solul se adăunează cu un substrat organic adecvat, de exemplu praf de făină de lucernă verde (component principal: *Medicago sativa*) cu un raport C/N între 12/1 și 16/1. Raportul lucernă-sol recomandat este de 5 g lucernă pe kilogram de sol (greutate uscată).

**1.6.5. Pregătirea substanței de testat pentru aplicarea pe sol**

Substanța de testat se aplică de obicei cu ajutorul unui excipient. Excipientul poate fi reprezentat de apă (în cazul substanțelor solubile în apă) sau de o substanță solidă inertă cum este nisipul cuarțos fin (dimensiunea particulelor: 0,1-0,5 mm). Se vor evita excipienții lichizi alții decât apa (de exemplu solvenții organici cum sunt acetona și cloroformul) deoarece pot afecta microflora. Dacă se folosește nisip ca excipient, acesta poate fi tratat cu substanța de testat dizolvată sau în suspensie într-un solvent adecvat. În acest caz, solventul se elimină prin evaporare înainte de amestecarea excipientului în sol. Pentru distribuirea optimă a substanței de testat în sol, se recomandă un raport de 10 g de nisip pe kilogram de sol (greutate uscată). Probele martor se tratează numai cu o cantitate echivalentă de apă și/sau de nisip cuarțos.

Pentru testarea substanțelor chimice volatile, se evită în cea mai mare măsură posibilă pierderile din perioada tratamentului și se încearcă repartizarea omogenă în sol (de exemplu, substanța de testat se injectează în sol în mai multe locuri).

**1.6.6. Concentrațiile de testare**

Dacă se testează produse agrochimice se folosesc cel puțin două concentrații. Concentrația mai mică trebuie să fie cel puțin egală cu cantitatea maximă susceptibilă să ajungă în sol în condiții reale, iar concentrația maximă trebuie să fie un multiplu al concentrației mai mici. Concentrațiile substanței de testat adăugate în sol se calculează presupunând că încorporarea se realizează uniform, la o adâncime de 5 cm, și că densitatea aparentă a solului este de 1,5. Pentru produsele agrochimice aplicate direct pe sol, sau în cazurile în care cantitatea de substanță chimică ce pătrunde în sol este previzibilă, concentrațiile de testare recomandate sunt concentrația maximă anticipată în mediu (PEC) și o concentrație de cinci ori mai mare. Pentru substanțele care se aplică pe sol de mai multe ori în același sezon, se testează concentrații calculate prin înmulțirea PEC cu numărul maxim de aplicări anticipate. Cu toate acestea, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să depășească de mai mult de zece ori doza maximă aplicată o dată. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosește o serie geometrică de cel puțin cinci concentrații. Concentrațiile testate trebuie să acopere intervalul necesar pentru determinarea valorilor CE<sub>x</sub>.

**▼B**

## 1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.7.1. **Condiții de expunere**1.7.1.1 *Lotul tratat și lotul martor*

Dacă se testează produse agrochimice, solul se împarte în trei părți cu greutate egală. Două părți se amestecă cu excipient conținând produsul, iar cealaltă se amestecă cu excipient fără produs (martor). Se recomandă pregătirea a cel puțin trei duplicate, atât pentru solul tratat, cât și pentru cel netratat. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, solul se împarte în șase părți cu greutate egală. Cinci probe se amestecă cu excipient conținând produsul, iar a șasea se amestecă cu excipient fără substanță. Se recomandă pregătirea a trei duplicate atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor. Se va acorda atenție repartizării omogene a substanței de testat în probele de sol tratate. În timpul amestecării se va evita comprimarea sau compactarea solului.

1.7.1.2. *Incubarea probelor de sol*

Incubarea probelor de sol se poate realiza în două moduri: în vrac pentru probele de sol tratat și netratat sau sub forma unor serii de subprobe individuale de dimensiuni identice de sol tratat și netratat. Cu toate acestea, dacă se testează substanțe volatile, testul se efectuează numai pe o serie de subprobe individuale. Dacă solul se incubează în vrac, se prepară cantități mari de sol tratat și netratat și se prelevează subprobe după cum este necesar pe parcursul testului. Cantitatea pregătită inițial atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor depinde de dimensiunea subprobelor, de numărul de duplicate utilizate pentru analiză și de numărul maxim de prelevări preconizat. Solurile incubate în vrac se amestecă bine înainte de prelevarea subprobelor. Dacă solurile se incubează sub forma unor serii de probe individuale, atât solul tratat cât și solul martor se împart în numărul de subprobe necesare, care se folosesc după cum este necesar. Pentru experimentele pentru care se preconizează mai mult de două prelevări se pregătește o cantitate de subprobe suficientă pentru toate duplicatele și pentru toate prelevările. Se incubează în mediu aerob cel puțin trei probe duplicate din solul testat (a se vedea punctul 1.7.1.1). În cadrul tuturor testelor se utilizează recipiente adecvate care asigură suficient spațiu liber pentru a evita apariția unor condiții anaerobe. Dacă se testează substanțe volatile, testul se realizează pe o singură serie de subprobe individuale.

1.7.1.3. *Condițiile de testare și durata testului*

Testul se realizează la întuneric și la o temperatură a camerei de  $20 \pm 2$  °C. Pe parcursul testului conținutul de apă al probei de sol se menține la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei a solului respectiv (a se vedea punctul 1.6.4.2), cu o marjă de  $\pm 5$  %. Se poate adăuga apă distilată, deionizată, după cum este necesar.

Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă se testează produse agrochimice, se compară ratele de formare de nitrați în probele tratate și în probele martor. Dacă în a 28-a zi aceste diferențe sunt mai mari de 25 %, testul se continuă până la obținerea unei diferențe de 25 % sau mai mică, sau timp de cel mult 100 de zile. Pentru alte produse decât cele agrochimice, testul este oprit după 28 de zile. În ziua 28 se măsoară cantitățile de nitrat formate în probele de sol tratate și în probele de sol martor și se calculează valorile  $CE_x$ .

**▼B****1.7.2. Prelevarea și analiza solurilor****1.7.2.1. Programul de prelevare a probelor de sol**

Dacă se testează produse agrochimice, se analizează nitratul din probele de sol în zilele 0, 7, 14 și 28. Dacă este necesară prelungirea testului, după ziua 28 se efectuează măsurători suplimentare la intervale de 14 zile.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosesc cel puțin cinci concentrații și se analizează probele de sol în vederea măsurării nitraturii la începutul (ziua 0) și la sfârșitul perioadei de expunere (28 de zile). Dacă se consideră necesar, se poate realiza o măsurătoare suplimentară, de exemplu în ziua 7. Datele obținute în ziua 28 se folosesc pentru determinarea valorii  $CE_x$  a substanței chimice. Datele din ziua 0 privind probele martor pot fi utilizate pentru raportarea cantității inițiale de nitrat din sol.

**1.7.2.2. Analiza probelor de sol**

Cantitatea de nitrat formată în fiecare probă tratată și martor duplicat se determină la fiecare prelevare. Nitratul se extrage din sol prin agitare probelor în prezența unui solvent de extracție, de exemplu o soluție 0,1 M de clorură de potasiu. Se recomandă utilizarea a 5 ml de soluție de KCl pe gram echivalent de greutate uscată de sol. Pentru optimizarea extracției, recipientele care conțin sol și soluție de extracție nu trebuie umplute mai mult de jumătate. Amestecul se agită la 150 rpm timp de 60 de minute. Amestecurile se centrifughează sau se filtrează și se analizează prezența nitraturii în faza lichidă. Extractele lichide din care au fost eliminate particulele se pot depozita înainte de a fi supuse analizei la  $-20 \pm 5$  °C timp de până la șase luni.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Dacă se testează produse agrochimice, se înregistrează cantitatea de nitrat formată în fiecare probă de sol duplicat și se furnizează valorile medii pentru toate duplicatele într-un tabel. Ratele de transformare a azotului se evaluează prin metode statistice adecvate și general acceptate (de exemplu testul F, nivelul semnificativ de 5 %). Cantitățile de nitrat formate se exprimă în mg nitrat/kg greutate uscată/zi. Se compară rata formării de nitrat din fiecare probă tratată cu rata pentru proba martor și se calculează deviația procentuală față de această valoare.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se determină cantitatea de nitrat formată în fiecare duplicat și se trasează curba doză-răspuns în vederea determinării valorilor  $CE_x$ . Cantitățile de nitrat (adică mg nitrat/kg greutate uscată de sol) determinate în probele tratate după 28 de zile se compară cu cele determinate pentru proba martor. Pe baza acestor date se calculează valorile de inhibare exprimate procentual pentru fiecare concentrație de testare. Aceste procente sunt reprezentate în funcție de concentrație și se folosesc proceduri statistice pentru calcularea valorilor  $CE_x$ . Se determină și pragurile de încredere ( $p = 0,95$ ) pentru  $CE_x$  calculate cu ajutorul procedurilor standard (10) (11) (12).

Substanțele de testat care conțin cantități mari de azot pot contribui la formarea de nitrat în timpul testului. Dacă aceste substanțe se testează în concentrații mari (de exemplu, în cazul substanțelor chimice care se anticipează că vor fi utilizate pentru aplicații repetate) trebuie incluși în cadrul testului martori adecvați (de exemplu sol plus substanță de testat, dar nu și făină vegetală). Datele obținute pentru aceste probe martor trebuie luate în considerare la calcularea  $CE_x$ .

**▼B****2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Dacă la evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe agrochimice se constată că diferența dintre ratele de formare a nitratului pentru proba tratată cu concentrația cea mai mică (concentrația maximă previzibilă) și pentru proba martor este, după 28 de zile, mai mică sau egală cu 25 % indiferent de momentul recoltării, se consideră că produsul în cauză nu influențează pe termen lung transformarea azotului în sol. Pentru evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe chimice altele decât produsele agrochimice se folosesc valorile CE<sub>50</sub>, CE<sub>25</sub> și/sau CE<sub>10</sub>.

**3. RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Date complete de identificare a solului utilizat, inclusiv:

- coordonatele geografice ale locului (latitudine, longitudine);
- informații privind istoricul locului (de exemplu, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, contaminările accidentale etc.);
- tipul de utilizare (de exemplu sol agricol, forestier etc.);
- adâncimea de prelevare a probelor (cm);
- conținutul de nisip/aluviuni/argilă ( % greutate uscată);
- pH (în apă);
- conținut de carbon organic ( % greutate uscată);
- conținut de azot ( % greutate uscată);
- concentrație inițială de nitrat (mg nitrat/kg greutate uscată);
- capacitate de schimb de cationi (mmol/kg);
- biomasă microbiană ca procent de carbon organic total;
- metode de referință utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;
- toate informațiile privind prelevarea și depozitarea probelor de sol;
- detalii privind preincubarea solului, dacă este cazul.

Substanța de testat:

- natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice;
- date de identificare a substanțelor chimice, dacă este cazul, inclusiv formula structurală, puritatea (pentru produsele fitosanitare procentul reprezentat de ingredientul activ), conținutul de azot.

Substrat:

- sursa substratului;
- compoziție (făină de lucernă, făină de lucernă verde);
- conținut de carbon, de azot ( % greutate uscată);
- dimensiunea sitei (mm).

**▼B**

Condiții de testare:

- detalii privind adăugarea solului cu substrat organic;
- numărul de concentrații ale substanței de testat utilizate și, dacă este cazul, justificarea concentrațiilor selectate;
- detalii privind aplicarea substanței de testat pe sol;
- temperatura de incubare;
- conținutul de apă al solului la începutul testului și pe parcursul derulării acestuia;
- metoda de incubare a solului utilizată (de exemplu, în vrac sau sub forma unei serii de subprobe individuale);
- numărul de duplicate;
- numărul de prelevări;
- metoda utilizată pentru extragerea nitratului din sol.

Rezultate:

- procedura analitică și echipamentul utilizate pentru analizarea nitratului;
- date sub formă de tabel privind valorile individuale și medii ale măsurătorilor privind nitratul;
- variațiile la nivelul duplicatelor probelor tratate și al duplicatelor probelor martor;
- explicații privind ajustările calculelor, dacă este cazul;
- variația procentuală a ratelor de formare a nitratului la fiecare prelevare sau, dacă este cazul, valoarea  $CE_{50}$  cu un prag de încredere de 95 la sută, celelalte valori  $CE_x$  ( $CE_{25}$  sau  $CE_{10}$ ) cu pragurile de încredere, și un grafic al curbei doză-răspuns;
- tratamentul statistic aplicat rezultatului;
- toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
2. BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
3. EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
4. SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
5. ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

**▼B**

6. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
7. ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
8. ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
9. ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
10. Litchfield, J. T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, p. 99-113.
11. Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
12. Finney, D. J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.



## C.22. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A CARBONULUI

### 1. METODĂ

Această metodă de testare reia Orientarea 217 (2000) a OCDE.

#### 1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare constă dintr-o metodă de laborator elaborată pentru studierea efectelor pe termen lung ale produselor fitosanitare și ale substanțelor chimice, după o singură expunere, asupra activității de transformare a carbonului de către microorganismele din sol. Testul se bazează în principal pe recomandările emise de Organizația europeană și mediteraneană pentru protecția plantelor (1). Cu toate acestea, au fost avute în vedere și alte linii directoare, inclusiv cele emise de Biologische Bundesanstalt din Germania (2) și de Agenția pentru protecția mediului a Statelor Unite (3) din cadrul SETAC (4). Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (5). Recomandările privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol au la bază liniile directoare ISO (6) și recomandările atelierului de la Belgirate.

Pentru determinarea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor de testat, este posibil să fie necesară determinarea efectelor acestora asupra activității microbiene din sol, de exemplu dacă sunt necesare date privind potențialele efecte secundare ale produselor fitosanitare asupra microflorei din sol sau în cazul riscurilor de expunere a microorganismelor din sol la alte substanțe chimice decât cele din produsele fitosanitare. Testul de transformare a carbonului se efectuează pentru a determina efectele acestor substanțe chimice asupra microflorei din sol. Dacă se testează produse agrochimice (de exemplu produse fitosanitare, îngrășăminte, produse chimice de uz silvic) se efectuează atât testul de transformare a carbonului, cât și testul de transformare a azotului. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice este suficient testul de transformare a azotului. Cu toate acestea, dacă valorile  $CE_{50}$  obținute în cadrul testului de transformare a azotului pentru substanțele în cauză se încadrează în intervalul de valori caracteristice inhibitorilor de nitrificare disponibili comercial (de exemplu nitrapirin), se poate efectua și un test de transformare a carbonului în vederea obținerii de informații suplimentare.

Solurile sunt formate din componente vii și din componente non-vii care formează amestecuri complexe și eterogene. Microorganismele joacă un rol important în descompunerea și transformarea materiei organice în sol fertil, multe specii aducându-și contribuția la diferitele aspecte ale fertilizării solurilor. Orice interferență pe termen lung în aceste procese biochimice riscă să perturbe ciclul elementelor nutritive și, în consecință, să altereze fertilitatea solului. Transformarea azotului și transformarea carbonului se produc în toate solurile fertile. Deși coloniile microbiene care determină aceste procese diferă de la un sol la altul, căile de transformare sunt în mare aceleași.

## ▼B

Prezența metodă de testare a fost elaborată în vederea detectării efectelor adverse pe termen lung ale unei substanțe asupra procesului de transformare a carbonului în solurilor aerobe de suprafață. Testul este sensibil la modificările dimensiunilor și activității coloniilor microbiene care determină transformarea carbonului deoarece supune aceste colonii atât unui stres chimic, cât și unor carențe de carbon. Se folosește un sol nisipos sărac în substanțe organice. Acesta se tratează cu substanța de testat și se incubează în condiții care permit un metabolism microbial rapid. În aceste condiții, sursele de carbon prezente în sol se epuizează rapid. Astfel sunt provocate carențe de carbon care produc moartea celulelor microbiene și induc o stare latentă/sporogeneză. Dacă durata testului depășește 28 de zile, se poate măsura suma acestor reacții la nivelul probelor martor (sol netratat) prin măsurarea dispariției progresive a biomasei microbiene cu activitate metabolică (7). Dacă biomasa dintr-un sol cu carențe de carbon este afectată în cadrul testului de prezența unei substanțe chimice, este posibil ca aceasta să nu ajungă la același nivel ca și proba martor. De aceea este adesea posibil ca perturbările provocate de substanța de testat în orice moment de pe parcursul testului să se mențină până la finalul testului.

Testele pe baza cărora a fost elaborată această metodă de testare au fost concepute în primul rând pentru cazurile în care cantitatea de substanță care pătrunde în sol poate fi estimată. Este, de exemplu, cazul produselor fitosanitare a căror doză de aplicare pe sol este cunoscută. Pentru produsele agrochimice este suficient un test cu două doze reprezentative pentru aplicarea pe sol anticipată sau estimată. Produsele agrochimice pot fi testate ca principii active (p.a.) sau ca produse preparate. Cu toate acestea, testul nu se limitează la produse cu concentrații anticipate în mediu previzibile. Modificând atât cantitatea de substanță de testat aplicată pe sol, cât și modul de evaluare a datelor, testul poate fi utilizat și pentru cazurile în care nu se cunoaște cantitatea de substanță care pătrunde în sol. Astfel, în cazul altor substanțe chimice decât produsele agrochimice, se determină efectele unei serii de concentrații asupra transformării carbonului. Datele obținute în cadrul acestor teste se folosesc pentru trasarea curbei doză-efect și pentru calcularea valorilor  $CE_x$ , unde x se definește ca fiind efectul procentual.

## 1.2 DEFINIȚII

**Transformare a carbonului:** degradarea materiei organice de către microorganisme până la formarea produsului final, dioxidul de carbon.

**$CE_x$  (Concentrația efectivă):** este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu x la sută transformarea carbonului în dioxid de carbon.

**$CE_{50}$  (Concentrația mediană efectivă):** este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu 50 la sută (50 %) transformarea carbonului în dioxid de carbon.

## 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.



**▼B****1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Solul cernut se tratează cu substanța de testat sau se lasă netratat (martor). Dacă testul vizează produse agrochimice, se recomandă utilizarea a cel puțin două concentrații, care trebuie alese în funcție de concentrația maximă previzibilă de pe teren. După 0, 7, 14 zile și 28 de zile de incubație, probele de sol tratate și probele martor se amestecă cu glucoză și se măsoară rata respirației induse de glucoză timp de 12 ore consecutiv. Rata respirației se exprimă ca dioxid de carbon degajat (mg dioxid de carbon/kg sol uscat/h) sau ca oxigen consumat (mg oxigen/kg sol/h). Rata medie de respirație a probelor de sol tratate se compară cu cea a probelor martor și se calculează deviația procentuală dintre probele tratate și probele martor. Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă în a 28-a zi diferențele dintre solurile tratate și cele netratate sunt mai mari sau egale cu 25 %, se continuă efectuarea de măsurători la intervale de 14 zile timp de cel mult 100 de zile. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, în probele de sol se adaugă o serie de concentrații ale substanței de testat și se măsoară ratele de respirație induse de glucoză (de exemplu cantitățile medii de dioxid de carbon format sau de oxigen consumat) după 28 de zile. Rezultatele testelor cu mai multe concentrații se analizează cu ajutorul unui model bazat pe regresie și se calculează valorile  $CE_x$  (de exemplu  $CE_{50}$ ,  $CE_{25}$  și/sau  $CE_{10}$ ). A se vedea definițiile.

**1.5. VALABILITATEA TESTULUI**

Evaluarea rezultatelor testelor efectuate asupra produselor agrochimice se bazează pe diferențe relativ mici (adică valori medii de  $\pm 25$  %) dintre dioxidul de carbon eliberat sau oxigenul consumat în (sau de către) probele martor și probele tratate de sol, fapt care poate determina obținerea unor rezultate false dacă există variații mari între probele martor. De aceea variațiile dintre probele martor trebuie să fie mai mici de  $\pm 15$  %.

**1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.6.1. Aparatură**

Se folosesc recipiente de testare confecționate din materiale inerte din punct de vedere chimic. Aceste recipiente trebuie să aibă o capacitate adecvată procedurii de incubare a solului utilizate, de exemplu incubare în vrac sau sub forma unei serii de probe individuale (a se vedea punctul 1.7.1.2). Pierderile de apă trebuie reduse la minimum și trebuie să se poată realiza schimbul de gaze (de exemplu, recipientele de testare se pot acoperi cu folie perforată de polietilenă). Dacă se testează substanțe volatile, se folosesc recipiente ermetice și etanșe la gaz. Dimensiunea recipientelor se alege astfel încât numai un sfert din volumul acestora să fie ocupat de proba de sol.

Pentru determinarea respirației induse de glucoză sunt necesare sisteme de incubare și instrumente de măsurare a producției de dioxid de carbon și a consumului de oxigen. În literatură există exemple de astfel de sisteme și instrumente (8) (9) (10) (11).

**1.6.2. Selectarea solurilor și numărul acestora**

Se folosește un singur sol. Caracteristicile recomandate ale acestuia sunt următoarele:

— conținut de nisip: cel puțin 50 % dar nu mai mult de 75 %;

**▼B**

— pH: 5,5-7,5;

— conținut de carbon organic: 0,5-1,5 %;

— se măsoară biomasa microbiană (12) (13), al cărei conținut de carbon trebuie să reprezinte cel puțin 1 % din carbonul organic total din sol.

În majoritatea cazurilor, un sol cu caracteristicile descrise anterior reprezintă cele mai nefavorabile condiții posibil, deoarece adsorbția substanței de testat este minimă, iar expunerea acesteia la microfloră este maximă. De aceea în general nu este necesar să se efectueze teste pe alte soluri. Cu toate acestea, în anumite situații, dacă principala utilizare preconizată a substanței de testat vizează în special soluri de tipul solurilor forestiere acide, sau în cazul substanțelor chimice cu sarcină electrostatică, poate fi necesară utilizarea unui sol suplimentar.

### 1.6.3. **Prelevarea și depozitarea probelor de sol**

#### 1.6.3.1. *Prelevare*

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale. Locul ales pentru prelevarea solului trebuie să poată fi utilizat pe termen lung. Pășunile permanente, câmpurile plantate cu cereale anuale (cu excepția porumbului) sau semănături dese cu îngrășăminte vegetale sunt adecvate în acest sens. Locul de prelevare selectat trebuie să nu fi fost tratat cu produse fitosanitare timp de cel puțin un an înainte de prelevarea probelor. De asemenea, trebuie să nu fi fost aplicat niciun îngrășământ organic cel puțin pe parcursul ultimelor șase luni. Utilizarea îngrășămintelor minerale este acceptabilă numai dacă respectă cerințele de cultivare și dacă nu se prelevează probe de sol mai repede de trei luni de la aplicarea îngrășământului. Trebuie evitată utilizarea unor soluri tratate cu îngrășăminte cu efecte biocide cunoscute (de exemplu cianamidă de calciu).

Se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (de peste 30 de zile) de secetă sau de saturare cu apă. În cazul solurilor arate, probele se recoltează de la o adâncime situată între 0 și 20 cm. În cazul pășunilor sau al altor soluri care nu sunt arate pe parcursul unor perioade lungi (cel puțin pe parcursul unei perioade de creștere), adâncimea maximă de prelevare poate fi puțin mai mare de 20 cm (de exemplu 25 cm). Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură de natură să garanteze că proprietățile sale inițiale nu se modifică în mod semnificativ.

#### 1.6.3.2. *Depozitare*

Este preferabil ca solurile utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren. Dacă nu se poate evita depozitarea în laborator, solurile se depozitează la întuneric, la temperaturi de  $4 \pm 2$  °C timp de maximum trei luni. Pe parcursul depozitării solurilor trebuie asigurate condiții aerobe. Dacă solurile sunt prelevate dintr-o zonă în care sunt afectate de îngheț timp de cel puțin trei luni pe an, se poate avea în vedere depozitarea acestora timp de șase luni la minus 18 °C. Biomasa microbiană a solurilor depozitate se măsoară înaintea fiecărui experiment, iar conținutul de carbon din biomasă trebuie să fie de cel puțin 1 % din conținutul total de carbon organic al solului (a se vedea punctul 1.6.2).

**▼B****1.6.4. Manipularea și pregătirea solului pentru test****1.6.4.1. Preincubarea**

Dacă solul a fost depozitat (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3), se recomandă pre-incubarea timp de 2 până la 28 de zile. Temperatura și conținutul de umiditate al solului în perioada de pre-incubare trebuie să fie similare cu cele din cadrul testului (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3).

**1.6.4.2. Proprietăți fizice și chimice**

Se curăță manual solul de obiectele mari (de exemplu pietre, resturi vegetale etc.) apoi se cerne umed fără uscare excesivă pentru a se obține particule cu o dimensiune mai mică sau egală cu 2 mm. Conținutul de apă al probei de sol se ajustează cu apă distilată sau deionizată până la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei.

**1.6.5. Pregătirea substanței de testat pentru aplicarea pe sol**

Substanța de testat se aplică de obicei cu ajutorul unui excipient. Excipientul poate fi reprezentat de apă (în cazul substanțelor solubile în apă) sau de o substanță solidă inertă cum este nisipul cuarțos fin (dimensiunea particulelor: 0,1-0,5 mm). Se vor evita excipienții lichizi alții decât apa (de exemplu solvenții organici cum sunt acetona și cloroformul) deoarece pot afecta microflora. Dacă se folosește nisip ca excipient, acesta poate fi tratat cu substanța de testat dizolvată sau în suspensie într-un solvent adecvat. În acest caz, solventul se elimină prin evaporare înainte de amestecarea excipientului în sol. Pentru distribuirea optimă a substanței de testat în sol, se recomandă un raport de 10 g de nisip pe kilogram de sol (greutate uscată). Probele martor se tratează numai cu o cantitate echivalentă de apă și/sau de nisip cuarțos.

Pentru testarea substanțelor chimice volatile, se evită în cea mai mare măsură posibilă pierderile din perioada tratamentului și se încearcă repartizarea omogenă în sol (de exemplu, substanța de testat se injectează în sol în mai multe locuri).

**1.6.6. Concentrațiile de testare**

Dacă se testează produse fitosanitare sau alte produse chimice cu concentrații anticipate în mediu previzibile, se folosesc cel puțin două concentrații. Concentrația mai mică trebuie să fie cel puțin egală cu cantitatea maximă susceptibilă să ajungă în sol în condiții reale, iar concentrația maximă trebuie să fie un multiplu al concentrației mai mici. Concentrațiile substanței de testat adăugate în sol se calculează presupunând că încorporarea se realizează uniform, la o adâncime de 5 cm, și că densitatea aparentă a solului este de 1,5. Pentru produsele agrochimice aplicate direct pe sol, sau în cazurile în care cantitatea de substanță chimică ce pătrunde în sol este previzibilă, concentrațiile de testare recomandate sunt concentrația anticipată în mediu (PEC) și o concentrație de cinci ori mai mare. Pentru substanțele care se aplică pe sol de mai multe ori în același sezon, se testează concentrații calculate prin înmulțirea PEC cu numărul maxim de aplicări anticipate. Cu toate acestea, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să depășească de mai mult de zece ori doza maximă aplicată o dată.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosește o serie geometrică de cel puțin cinci concentrații. Concentrațiile testate trebuie să acopere intervalul necesar pentru determinarea valorilor  $CE_x$ .

**▼B****1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI****1.7.1. Condiții de expunere****1.7.1.1. Lotul tratat și lotul martor**

Dacă se testează produse agrochimice, solul se împarte în trei părți cu greutate egală. Două părți se amestecă cu excipient conținând produsul, iar cealaltă se amestecă cu excipient fără produs (martor). Se recomandă pregătirea a cel puțin trei duplicate, atât pentru solul tratat, cât și pentru cel netratat. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, solul se împarte în șase părți cu greutate egală. Cinci probe se amestecă cu excipient conținând substanța de testat, iar a șasea se amestecă cu excipient fără substanță. Se recomandă pregătirea a trei duplicate atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor. Se va acorda atenție repartizării omogene a substanței de testat în probele de sol tratate. În timpul amestecării se va evita comprimarea sau compactarea solului.

**1.7.1.2. Incubarea probelor de sol**

Incubarea probelor de sol se poate realiza în două moduri: în vrac pentru probele de sol tratat și netratat sau sub forma unor serii de subprobe individuale de dimensiuni identice de sol tratat și netratat. Cu toate acestea, dacă se testează substanțe volatile, testul se efectuează numai pe o serie de subprobe individuale. Dacă solul se incubează în vrac, se prepară cantități mari de sol tratat și netratat și se prelevează subprobe după cum este necesar pe parcursul testului. Cantitatea pregătită inițial atât pentru probele tratate cât și pentru probele martor depinde de dimensiunea subprobelor, de numărul de duplicate utilizate pentru analiză și de numărul maxim de prelevări preconizat. Solurile incubate în vrac se amestecă bine înainte de prelevarea subprobelor. Dacă solurile se incubează sub forma unor serii de probe individuale, atât solul tratat cât și solul martor se împart în numărul de subprobe adecvat, care se folosesc după cum este necesar. Pentru experimentele pentru care se preconizează mai mult de două prelevări se pregătește o cantitate de subprobe suficientă pentru toate duplicatele și pentru toate prelevările. Se incubează în mediu aerob cel puțin trei probe duplicate din solul testat (a se vedea punctul 1.7.1.1). În cadrul tuturor testelor se utilizează recipiente adecvate care asigură suficient spațiu liber pentru a evita apariția unor condiții anaerobe. Dacă se testează substanțe volatile, testul se realizează pe o singură serie de subprobe individuale.

**1.7.1.3. Condițiile de testare și durata testului**

Testul se realizează la întuneric și la o temperatură a camerei de  $20 \pm 2$  °C. Pe parcursul testului conținutul de apă al probei de sol se menține la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei a solului respectiv (a se vedea punctul 1.6.4.2), cu o marjă de  $\pm 5$  %. Se poate adăuga apă distilată, deionizată, după cum este necesar.

Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă se testează produse agrochimice, se compară cantitățile de dioxid de carbon eliberat de probele tratate și de probele martor. Dacă în a 28-a zi aceste diferențe sunt mai mari de 25 %, testul se continuă până la obținerea unei diferențe de 25 % sau mai mică, sau timp de cel mult 100 de zile. Pentru alte produse decât cele agrochimice, testul este oprit după 28 de zile. În ziua 28 se măsoară cantitățile de dioxid de carbon eliberate sau de oxigen consumat de probele de sol tratate și de probele de sol martor și se calculează valorile  $CE_x$ .

**▼B****1.7.2. Prelevarea și analiza solurilor****1.7.2.1. Programul de prelevare a probelor de sol**

Dacă se testează produse agrochimice, se analizează ratele respirației induse de glucoză în probele din sol în zilele 0, 7, 14 și 28. Dacă este necesară prelungirea testului, după ziua 28 se efectuează măsurători suplimentare la intervale de 14 zile.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosesc cel puțin cinci concentrații și se analizează probele de sol în vederea măsurării nitratului la începutul (ziua 0) și la sfârșitul perioadei de expunere (28 de zile). Dacă se consideră necesar, se poate realiza o măsurătoare suplimentară, de exemplu în ziua 7. Datele obținute în ziua 28 se folosesc pentru determinarea valorii  $CE_x$  a substanței chimice. Datele din ziua 0 privind probele martor pot fi utilizate pentru estimarea cantității inițiale de biomasă microbiană cu activitate metabolică din sol (12).

**1.7.2.2. Măsurarea ratelor de respirație induse de glucoză**

Rata respirației induse de glucoză se determină pentru fiecare probă de sol tratat și pentru fiecare probă martor la fiecare prelevare. Probele de sol se amestecă cu o cantitate de glucoză suficientă pentru a antrena o reacție respiratorie maximă imediată. Cantitatea de glucoză necesară pentru provocarea unei reacții respiratorii maxime într-un anumit sol se poate determina cu ajutorul unui test preliminar cu mai multe concentrații de glucoză (14). Cu toate acestea, în cazul solurilor nisipoase cu un conținut de carbon organic de 0,5-1,5 % sunt de obicei suficiente 2 000-4 000 mg de glucoză pe kg greutate uscată de sol. Glucoza se poate măcina în pulbere cu nisip cuarțos fin (10 g nisip/kg greutate uscată) și se amestecă omogen în sol.

Probele de sol adăugate cu glucoză se incubează într-un aparat adaptat pentru măsurarea continuă a ratei de respirație la fiecare oră sau la fiecare două ore (a se vedea punctul 1.6.1) la  $20 \pm 2$  °C. Se măsoară dioxidul de carbon degajat sau oxigenul consumat timp de 12 ore consecutive, iar măsurătorile se inițiază cât mai repede posibil, adică după 1-2 ore de la adăugarea glucozei. Se măsoară cantitatea totală de dioxid de carbon degajat sau de oxigen consumat pe parcursul a 12 ore și se determină ratele medii de respirație.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Dacă se testează produse agrochimice, se înregistrează cantitatea de dioxid de carbon eliberat sau de oxigen consumat de fiecare probă de sol duplicat și se furnizează valorile medii pentru toate duplicatele într-un tabel. Rezultatele se evaluează prin metode statistice adecvate și general acceptate (de exemplu testul F, nivelul semnificativ de 5 %). Rata de respirație indusă de glucoză se exprimă în mg dioxid de carbon/kg greutate uscată de sol/h sau în mg oxigen/greutate uscată de sol/h. Se compară rata medie a formării dioxidului de carbon sau rata medie a consumului de oxigen pentru fiecare probă tratată cu rata pentru proba martor și se calculează deviația procentuală față de această valoare.

**▼B**

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se determină cantitatea de dioxid de carbon eliberat sau de oxigen consumat de fiecare duplicat și se trasează curba doză-răspuns în vederea determinării valorilor  $CE_x$ . Ratele de respirație induse de glucoză (în mg dioxid de carbon/kg greutate uscată de sol/h sau în mg oxigen/greutate uscată de sol/h) determinate în probele tratate după 28 de zile se compară cu cele determinate pentru proba martor. Pe baza acestor date se calculează valorile de inhibare exprimate procentual pentru fiecare concentrație de testare. Aceste procente sunt reprezentate în funcție de concentrație, iar pentru calcularea valorilor  $CE_x$  se folosesc proceduri statistice. Se determină și pragurile de încredere ( $p = 0,95$ ) pentru  $CE_x$  calculate cu ajutorul procedurilor standard (15) (16) (17).

## 2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Dacă la evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe agrochimice se constată că diferența dintre ratele de respirație induse de glucoză pentru proba tratată cu concentrația cea mai mică (concentrația maximă previzibilă) și pentru proba martor este, după 28 de zile, mai mică sau egală cu 25 % indiferent de momentul recoltării, se consideră că produsul în cauză nu influențează pe termen lung transformarea carbonului în sol. Pentru evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe chimice altele decât produsele agrochimice se folosesc valorile  $CE_{50}$ ,  $CE_{25}$  și/sau  $CE_{10}$ .

## 3. RAPORT

### RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Date complete de identificare a solului utilizat, inclusiv:

- coordonatele geografice ale locului (latitudine, longitudine);
- informații privind istoricul locului (de exemplu, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, tratamentele cu îngrășăminte, contaminările accidentale etc.);
- tipul de utilizare (de exemplu sol agricol, forestier etc.);
- adâncimea de prelevare a probelor (cm);
- conținutul de nisip/aluviuni/argilă ( % greutate uscată);
- pH (în apă);
- conținut de carbon organic ( % greutate uscată);
- conținut de azot ( % greutate uscată);
- capacitate de schimb de cationi (mmol/kg);
- biomasă microbiană inițială ca procent de carbon organic total;
- metode de referință utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;
- toate informațiile privind prelevarea și depozitarea probelor de sol;
- detalii privind pre-incubarea solului, dacă este cazul.

**▼B**

Substanța de testat:

- natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice;
- date de identificare a substanțelor chimice, dacă este cazul, inclusiv formula structurală, puritatea (pentru produsele fitosanitare procentul de ingredient activ), conținutul de azot.

Condiții de testare:

- detalii privind adăugarea solului cu substrat organic;
- numărul de concentrații ale substanței de testat utilizate și, dacă este cazul, justificarea concentrațiilor selectate;
- detalii privind aplicarea substanței de testat pe sol;
- temperatura de incubație;
- conținutul de apă al solului la începutul testului și pe parcursul derulării acestuia;
- metoda de incubare a solului utilizată (de exemplu în vrac sau sub forma unei serii de subprobe individuale);
- numărul de duplicate;
- numărul de prelevări.

Rezultate:

- metoda și echipamentul utilizate pentru măsurarea ratelor de respirație;
- date sub formă de tabel privind cantitățile individuale și medii de dioxid de carbon sau de oxigen;
- variațiile la nivelul duplicatelor probelor tratate și al duplicatelor probelor martor;
- explicații privind ajustările calculelor, dacă este cazul;
- variația procentuală a ratelor de respirație induse de glucoză la fiecare prelevare sau, dacă este cazul, valoarea  $CE_{50}$  cu un prag de încredere de 95 la sută, celelalte valori  $CE_x$  ( $CE_{25}$  sau  $CE_{10}$ ) cu praguri de încredere și un grafic al curbei doză-răspuns;
- tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul;
- toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals, Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
2. BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
3. EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

## ▼B

4. SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
5. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
6. ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
7. Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora”. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
8. Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.
9. ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
10. ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
11. Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E. A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77-81.
12. ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
13. ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
14. Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113-120.
15. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, p. 99-113.
16. Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
17. Finney D. J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.



## ▼B

## C.23. TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SOL

## 1. METODĂ

Această metodă de testare reia Orientarea 307 (2002) a OCDE.

## 1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare se bazează pe liniile directoare existente (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metoda descrisă în continuare a fost elaborată pentru măsurarea transformărilor aerobe și anaerobe ale substanțelor chimice în sol. Scopul experimentelor este acela de a determina (i) rata de transformare a substanței de testat și (ii) natura și ratele de formare și de epuizare ale produșilor de transformare la care pot fi expuse plantele și organismele din sol. Aceste studii sunt necesare pentru substanțele chimice aplicate direct pe sol sau susceptibile să ajungă în mediul din sol. Rezultatele acestor studii de laborator pot fi, de asemenea, utilizate pentru elaborarea de protocoale de prelevare de probe și de analiză pentru studii din domenii înrudite.

În general, pentru evaluarea căilor de transformare este suficientă realizarea de studii aerobe și anaerobe pe un singur tip de sol (8) (10) (11). Ratele de transformare se determină pentru încă cel puțin trei alte soluri (8) (10).

Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului și a sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (10). Tipurile de sol testate trebuie să fie reprezentative pentru condițiile de mediu în care va fi utilizată sau eliberată substanța. De exemplu, substanțele chimice eliberate într-un climat subtropical sau tropical se testează cu Ferrasols sau Nitosols (sistemul FAO). În cadrul atelierului de lucru au fost de asemenea formulate recomandări privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol bazate pe liniile directoare ISO (15). În cadrul acestei metode se studiază și utilizarea solurilor de orezârie.

## 1.2. DEFINIȚII

**Substanță de testat:** orice substanță, indiferent dacă este vorba despre substanța mamă sau despre produșii de transformare relevanți.

**Produși de transformare:** toate substanțele rezultate din reacțiile biotice sau abiotice de transformare a substanței de testat, în special CO<sub>2</sub> și produșii din reziduurile legate.

**Reziduuri legate:** „reziduurile legate” sunt compuși vegetali sau animalii din sol, care persistă în matrice după extracție sub forma substanței mamă sau a metabolitului (metaboliților)/produșilor de transformare ai acesteia. Metoda de extracție nu trebuie să modifice considerabil compușii înșiși sau structura matricei. Natura legăturii poate fi determinată parțial prin metode de extracție care modifică matricea și prin tehnici analitice complexe. Până în prezent a fost identificată în acest mod natura legăturilor covalente, ionice, de sorbție și de captare. În general, formarea reziduurilor legate reduce bioaccesibilitatea și biodisponibilitatea în mod considerabil (12) [modificare IUPAC 1984 (13)].

**Transformare aerobă:** reacție care se produce în prezența oxigenului molecular (14).

**▼B**

**Transformare anaerobă:** reacție care se produce în absența oxigenului molecular (14).

**Sol:** este un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceștia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu masă moleculară mare, care conțin mici organisme (în special microorganisme). Solul poate fi manipulat în două forme:

- (a) nederanjat, așa cum s-a format în timp, în straturile caracteristice unui număr mare de tipuri de sol;
- (b) deranjat, așa cum se găsește de obicei pe terenurile arabile când probele se prelevează prin săpare și se folosesc în cadrul prezentei metode de testare (14).

**Mineralizare:** degradarea completă a unui compus organic în  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  în condiții aerobe și în  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  în condiții anaerobe. În cadrul prezentei metode de testare, dacă se folosește un compus marcat cu  $^{14}\text{C}$ , mineralizare înseamnă o degradare considerabilă pe parcursul căreia un atom de carbon marcat este oxidat, degajându-se o cantitate adecvată de  $^{14}\text{CO}_2$  (14).

**Timp de înjumătățire:**  $t_{0,5}$  este timpul necesar pentru transformarea a 50 % dintr-o substanță de testat în cazul transformărilor care pot fi descrise printr-o cinetică de prim ordin; nu depinde de concentrație.

**DT<sub>50</sub> (timp de degradare 50):** este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 50 %; diferă de timpul de înjumătățire  $t_{0,5}$  dacă transformarea nu respectă o cinetică de prim ordin.

**DT<sub>75</sub> (timp de degradare 75):** este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 75 %.

**DT<sub>90</sub> (timp de degradare 90):** este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 90 %.

### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Substanțele de referință se folosesc pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare prin metode spectroscopice și cromatografice.

### 1.4. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda se aplică tuturor substanțelor chimice (nemarcate sau marcate radioactiv) pentru care se poate utiliza o metodă analitică cu o precizie și o sensibilitate suficientă. Se aplică pentru compușii ușor volatili, nevolatili, solubili sau insolubili în apă. Testul nu se aplică substanțelor chimice puternic volatile în sol (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care de aceea nu pot fi menținute în sol în condițiile experimentale din cadrul acestui test.

**▼B****1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT**

Pentru măsurarea ratei de transformare se poate utiliza o substanță de testat marcată sau nemarcată. Materialul marcat este necesar pentru studierea căilor de transformare și pentru stabilirea bilanțului masic. Se recomandă marcarea cu  $^{14}\text{C}$  dar poate fi utilă și utilizarea altor izotopi cum sunt  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ . În măsura în care este posibil, marcajul se amplasează în partea (părțile) cea (cele) mai stabilă (stabile) ale moleculei <sup>(1)</sup>. Puritatea substanței de testat trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înainte de efectuarea unui test de transformare aerobă sau anaerobă în sol, sunt necesare următoarele informații privind substanța de testat:

- (a) solubilitatea în apă (metoda A.6);
- (b) solubilitatea în solvenți organici;
- (c) presiunea vaporilor (metoda A.4) și constanta lui Henry;
- (d) coeficientul de împărțire n-octanol/apă (metoda A.8);
- (e) stabilitatea chimică la întuneric (hidroliză) (metoda C.7);
- (f) coeficientul pKa dacă este posibil ca o moleculă să fie supusă unei protonări sau deprotonări (Orientarea 112 a OCDE) (16).

Este posibil să fie utile și informații privind toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor din sol (metodele de testare C.21 și C.22) (16).

Trebuie să fie disponibile metode analitice (inclusiv metode de extracție și de purificare) necesare pentru cuantificarea și identificarea substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia.

**1.6. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

Probele de sol se tratează cu substanța de testat și se incubează la întuneric în baloane de tip biometric sau în sisteme cu circulație continuă în condiții de laborator controlate (la temperatură și umiditate constantă). După un interval de timp adecvat, se extrag și se analizează probele de sol în vederea măsurării substanței mamă și a produșilor de transformare. Și produșii volatili se colectează în vederea efectuării unei analize cu ajutorul unor dispozitive de absorbție adecvate. Cu ajutorul materialului marcat cu  $^{14}\text{C}$  se pot măsura diferitele rate de mineralizare a substanței de testat prin captarea  $^{14}\text{CO}_2$  degajat și se poate stabili bilanțul masic, inclusiv formarea reziduurilor legate de sol.

**1.7. CRITERII DE CALITATE****1.7.1. Recupere**

Extracția și analizarea probelor de sol, cel puțin în duplicat, imediat după adăugarea substanței de testat, oferă o primă indicație privind repetabilitatea metodei analitice și uniformitatea procedurii de aplicare a substanței de testat. Ratele de recuperare din etapele ulterioare ale experimentelor sunt furnizate de bilanțurile masice respective. Aceste rate de recuperare variază între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate (8) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate (3).

<sup>(1)</sup> De exemplu, dacă substanța de testat conține un ciclu, acesta trebuie marcat; dacă substanța de testat conține două sau mai multe cicluri, este posibil să fie necesare studii separate pentru evaluarea evoluției fiecărui ciclu și pentru a obține informații fiabile privind formarea produșilor de transformare.

**▼B****1.7.2. Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea unei analize dublat pe același extract de sol, incubat suficient timp pentru a se forma produșii de transformare.

Pragul de detecție (LOD) a substanței de testat și a produșilor de transformare din cadrul metodei analitice trebuie să fie de cel puțin  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (substanță de testat) în sol sau de 1 % din doza aplicată, respectiv valoarea mai mică dintre acestea. Se precizează și pragul de cuantificare (LOQ).

**1.7.3. Precizia datelor privind transformarea**

Analiza de regresie a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp oferă informații adecvate privind fiabilitatea curbei de transformare și calcularea pragurilor de încredere pentru timpii de înjumătățire (în cazurile de cinetică de pseudo prim ordin) sau a valorilor  $DT_{50}$  și, dacă este cazul, a valorilor  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$ .

**1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.8.1. Echipament și reactivi chimici**

Incubatoarele sunt formate din circuite statice închise sau din sisteme cu circulație continuă (7) (17). În figurile 1 și 2 sunt prezentate exemple de incubatoare cu circulație continuă și de baloane de tip biometric. Ambele tipuri de incubatoare prezintă avantaje și inconveniente (7) (17).

Este necesar echipament standard de laborator, în special următoarele:

- instrumente de analiză cum sunt: cromatografie în fază gazoasă sau lichidă (GLC), cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC), echipament TLC, inclusiv sisteme adecvate pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a substanțelor nemarcate sau metoda diluției izotopice inverse;
- instrumente de identificare (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN etc.);
- contor de scintilație lichid;
- aparat de oxidare pentru combustia materialului radioactiv;
- centrifugă;
- aparat de extracție (de exemplu tuburi de centrifugare pentru extracția la rece și aparat Soxhlet pentru extracția continuă sub reflux);
- instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a extractelor (evaporator rotativ);
- baie de aburi;
- dispozitiv mecanic de amestecare (de exemplu malaxor, amestecător rotativ).

**▼B**

Printre reactivii chimici utilizați se numără, de exemplu:

- NaOH, puritate analitică,  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , sau altă bază adecvată (de exemplu KOH, etanolamină);
- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , puritate analitică,  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,
- etilen glicol, puritate analitică;
- materiale de absorbție solide, de exemplu var sodat sau tampoane poliuretane;
- solvenți organici, puritate analitică, cum sunt acetona, metanolul etc.;
- lichid de scintilație.

#### 1.8.2. **Aplicarea substanței de testat**

Substanța de testat se poate dizolva în apă (deionizată sau distilată) în vederea încorporării sau a distribuiri în sol, sau, dacă este necesar, se poate dizolva într-o cantitate minimă de acetonă sau de alți solvenți organici (6) dacă este suficient de solubilă și de stabilă. Cu toate acestea, cantitatea de solvent selectată nu trebuie să aibă o influență semnificativă asupra activității microbiene din sol (a se vedea punctele 1.5 și 1.9.2-1.9.3). Trebuie evitată utilizarea unor solvenți care inhibă activitatea microbiană cum sunt cloroformul, diclorometanul și alți solvenți halogenați.

Substanța de testat se poate adăuga și sub formă solidă, amestecată cu nisip cuarțos (6) sau într-o subprobă de sol uscat cu aer și sterilizată de mici dimensiuni. Dacă substanța de testat se adaugă cu ajutorul unui solvent, acesta se lasă să se evaporeze înainte ca subproba tratată să fie adăugată în proba inițială de sol nesterilă.

În cazul substanțelor chimice obișnuite, pentru care principala cale de pătrundere în sol este prin nămolul de epurare sau prin tratamente agricole, se începe prin adăugarea substanței de testat în nămol, care se introduce apoi în proba de sol (a se vedea punctele 1.9.2 și 1.9.3)

Nu se recomandă utilizarea de materiale preparate în mod sistematic. Cu toate acestea, de exemplu în cazul substanțelor puțin solubile, utilizarea de materiale preparate poate fi o soluție bună.

#### 1.8.3. **Soluri**

##### 1.8.3.1. *Selectarea solurilor*

Pentru determinarea căii de transformare se poate utiliza un sol reprezentativ; se recomandă argila nisipoasă sau lutul nisipos fin sau argila sau nisipul lutos [conform clasificării FAO și USDA (18)] cu un pH de 5,5-8,0, cu conținut de carbon organic de 0,5-2,5 % și cu o biomasă microbiană de cel puțin 1 % din carbonul organic total (10).

Pentru studiile privind ratele de transformare se folosesc cel puțin trei soluri suplimentare reprezentative pentru gama de soluri în cauză. Solurile trebuie să aibă pH-uri, conținuturi de argilă și biomase microbiene diferite (10).

## ▼B

Toate solurile se clasifică, cel puțin din punctul de vedere al texturii (% nisip, % aluviuni, % argilă) [conform clasificării FAO și USDA (18)], al pH-ului, al capacității de schimb de cationi, al densității aparente, al caracteristicilor de reținere a apei <sup>(1)</sup> și al biomasei microbiene (numai pentru studiile aerobe). Pentru interpretarea rezultatelor pot fi utile informații suplimentare privind proprietățile solului. Pentru determinarea caracteristicilor solului se pot utiliza metodele recomandate la referințe (19) (20) (21) (22) (23). Masa microbiană se determină prin metoda respirației induse de substrat (SIR) (25) (26) sau prin metode alternative (20).

#### 1.8.3.2. *Prelevarea, manipularea și depozitarea solurilor*

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu substanțe chimice, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau alte contaminări. Solurile tratate cu substanța de testat sau cu substanțe cu structură analogă pe parcursul ultimilor patru ani nu se folosesc în studiile de transformare (10) (15).

Solurile utilizate trebuie să fie proaspăt prelevate de pe teren (din orizontul A sau din stratul de 20 cm de la suprafață), și trebuie să aibă un conținut de apă care facilitează cernerea. Pentru alte soluri decât cele de orezărie, se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (> 30 zile) de secetă, de îngheț sau de inundații (14). Probele se transportă astfel încât să se reducă la minimum modificările conținutului de apă din sol și se păstrează la întuneric, asigurându-se circulația liberă a aerului în cea mai mare măsură posibil. În acest sens este în general adecvată o pungă de polietilenă care nu se închide ermetic.

Solul se prelucrează cât mai repede posibil după prelevare. Se scot resturile vegetale, animale și pietrele mari înainte de cernerea solului printr-o sită cu ochiuri de 2 mm care reține pietrele și resturile vegetale și animale de mici dimensiuni. Se va evita uscarea și măcinarea solului înainte de cernere (15).

În timpul iernii, când prelevarea de pe teren este dificilă (sol înghețat sau acoperit cu straturi de zăpadă) probele se pot preleva dintr-un lot de sol depozitat într-o seră cu acoperire vegetală (de exemplu un amestec de iarbă și trifoi). Sunt preferate în mod evident studiile efectuate pe sol proaspăt prelevat, dar dacă solul prelevat și prelucrat trebuie depozitat înainte de inițierea studiului, condițiile de depozitare trebuie să fie adecvate iar depozitarea să se realizeze pe parcursul unei perioade limitate ( $4 \pm 2$  °C timp de maximum trei luni) pentru menținerea activității microbiene <sup>(2)</sup>. Referințele 8, 10, 15, 26 și 27 conțin instrucțiuni detaliate privind prelevarea, manipularea și depozitarea solurilor utilizate în cadrul experimentelor de biotransformare.

<sup>(1)</sup> Caracteristica de reținere a apei a unui sol se poate măsura ca fiind capacitatea câmpului, ca fiind capacitatea de reținere a apei sau ca potențial de sucțiune (pF). Pentru explicații a se vedea apendicele 1. În raportul de testare se precizează dacă densitatea aparentă și caracteristica de reținere a apei au fost determinate pe probe de sol nederanjat sau deranjat (prelucrat).

<sup>(2)</sup> Cercetări recente au arătat că solurile din zonele cu climat temperat se pot depozita la – 20 °C timp de peste trei luni (18) (29) fără pierderi semnificative la nivelul activității microbiene.

## ▼B

Înainte de a fi utilizat în cadrul acestui test, solul tratat se preincubează pentru a permite germinarea și eliminarea semințelor și restabilirea echilibrului metabolismului microbial după trecerea de la condițiile de prelevare sau de depozitare la condițiile de incubare. În general este adecvat să se prevadă o perioadă de preincubare de 2 până la 28 de zile, aproximativ în condițiile de temperatură și de umiditate din cadrul testului real (15). În general durata de depozitare și de preincubare însumate nu trebuie să depășească trei luni.

## 1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI

### 1.9.1. Condiții de testare

#### 1.9.1.1 *Temperatura de testare*

Pe parcursul întregii perioade de testare, solurile se incubează la întuneric, la o temperatură constantă reprezentativă pentru condițiile climatice în care va fi utilizată sau eliberată substanța. Pentru toate substanțele testate care ajung în sol în climat temperat se recomandă o temperatură de  $20 \pm 2$  °C. Temperatura se monitorizează.

În cazul substanțelor aplicate sau eliberate într-un climat mai rece (de exemplu în țările nordice, în perioade de toamnă/iarnă), se incubează probe suplimentare de sol la o temperatură mai mică (de exemplu  $10 \pm 2$  °C).

#### 1.9.1.2 *Conținutul de umiditate*

Pentru testele de transformare în mediu aerob, conținutul de umiditate al solului <sup>(1)</sup> se ajustează și se menține la un pF cuprins între 2,0 și 2,5 (3). Conținutul de umiditate al solului se exprimă ca masă de apă pe masă de sol uscat și se controlează în mod regulat (de exemplu la intervale de 2 săptămâni) prin cântărirea balonului de incubare, iar pierderile de apă se compensează prin adăugarea de apă (de preferință apă de la robinet sterilizată prin filtrare). Pierderile de substanță de testat și/sau de produși de transformare prin volatilizare și/sau fotodegradare (dacă este cazul) produse când se adaugă apă se vor evita sau se vor reduce la minimum.

Pentru testele de transformare în condiții aerobe și de orezărie solul se saturează cu apă prin inundare.

#### 1.9.1.3 *Condiții aerobe de incubare*

În sistemele cu circulație continuă condițiile aerobe se mențin prin spălare intermitentă sau ventilare cu aer umezit. În baloanele de tip biometric, schimbul de aer se realizează prin difuziune.

#### 1.9.1.4 *Condiții aerobe sterile*

Pentru obținerea de informații privind importanța transformării abiotice a unei substanțe de testat probele de sol pot fi sterilizate (pentru metode de sterilizare a se vedea referințele 16 și 29), tratate cu o substanță de testat sterilă (de exemplu prin adăugarea de soluție printr-un filtru steril) și aerate cu aer steril umed după cum se arată la punctul 1.9.1.3. În cazul solurilor de orezărie, solul și apa se sterilizează, iar incubarea se efectuează după cum se arată în punctul 1.9.1.6.

<sup>(1)</sup> Solul nu trebuie să fie nici prea umed, nici prea uscat, astfel încât să se asigure condiții adecvate de aerare și de nutriție pentru microflora din sol. Conținuturile de umiditate recomandate pentru o creștere microbială optimă variază între 40-60 % din capacitatea de reținere de apă (WHC) și între 0,1-0,33 bari (6). Acest ultim interval corespunde unui interval de pF de 2,0-2,5. În apendicele 2 sunt prezentate conținuturile tipice de umiditate ale diferitelor tipuri de soluri.

**▼B****1.9.1.5. Condiții anaerobe de incubare**

Pentru crearea și menținerea condițiilor anaerobe, solul tratat cu substanța de testat și incubat în condiții aerobe timp de 30 de zile sau pe parcursul unei perioade egale cu timpul de înjumătățire sau cu  $DT_{50}$  (aceea dintre ele care este mai scurtă) se acoperă apoi cu apă (strat de apă de 1-3 cm), iar sistemul de incubare se clătește cu un gaz inert (de exemplu azot sau argon) <sup>(1)</sup>. Sistemul de testare trebuie să permită măsurarea pH-ului, a concentrației de oxigen și a potențialului redox și să conțină dispozitive de captare a produșilor volatili. Sistemul de tip biometric trebuie să fie închis pentru a evita orice intrare a aerului prin difuziune.

**1.9.1.6. Condiții de incubare în solurile de orezărie**

Pentru studierea transformării în solurile de orezărie, solul se inundă cu un strat de apă de 1-5 cm iar substanța de testat se introduce în faza apoasă (9). Se recomandă ca adâncimea stratului de sol să fie de cel puțin 5 cm. Sistemul se ventilează cu aer ca și în condiții aerobe. Se supraveghează și se înregistrează pH-ul, concentrația de oxigen și potențialul redox al stratului de apă. Înainte de începerea studiilor de transformare este necesară o perioadă de preincubare de cel puțin două săptămâni (a se vedea punctul 1.8.3.2).

**1.9.1.7. Durata testului**

În general, studiile privind rata și căile de transformare nu trebuie să depășească 120 de zile <sup>(2)</sup> (3) (6) (8), deoarece după acest termen sistemele artificiale de laborator în care nu se produce o reconstituire naturală sunt afectate în timp de o scădere a activității microbiene din sol. Dacă este necesară o caracterizare a epuizării substanței de testat și a formării și epuizării principalilor produși de transformare, studiile pot fi continuate pe parcursul unor perioade mai lungi (de exemplu între 6 și 12 luni) (8). Dacă se folosesc perioade de incubație mai lungi, acestea trebuie justificate în raportul de testare și trebuie menționate măsurătorile biomasei efectuate în timpul și la sfârșitul acestor perioade.

**1.9.2. Efectuarea testului**

Se introduc 50-200 g de sol (greutate uscată) în fiecare balon de incubare (a se vedea figurile 1 și 2 din apendicele 3) și se tratează cu substanța de testat cu ajutorul uneia dintre metodele descrise în punctul 1.8.2. Dacă pentru aplicarea substanței de testat se folosesc solvenți organici, aceștia se elimină din sol prin evaporare. În continuare, solul se mestecă bine cu o spatulă și/sau prin agitarea balonului. Dacă studiul se desfășoară în condiții de orezărie, solul și apa se amestecă bine după aplicarea substanței de testat. Se analizează substanța de testat prezentă în părți alicote mici (de exemplu 1 g) din solurile tratate pentru a verifica dacă repartizarea este uniformă. În continuare este prezentată o metodă alternativă.

<sup>(1)</sup> Condițiile aerobe sunt predominante în solurile de suprafață și chiar în solurile subterane, după cum au arătat rezultatele unui proiect de cercetare finanțat de UE [K. Takagi *et al.* (1992), Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., p. 270-277, 17-21 August, Sigtuna, Suedia]. Producerea condițiilor anaerobe este posibilă ocazional în timpul inundării solurilor după ploi abundente sau în cazul condițiilor de orezărie.

<sup>(2)</sup> Studiile aerobe pot fi încheiate în mai puțin de 120 de zile sub rezerva utilizării căii de transformare și a producerii mineralizării efective până la data respectivă. Testul poate fi încheiat după 120 de zile sau când cel puțin 90 % din substanța de testat este transformată, dar numai dacă s-a format cel puțin 5 %  $CO_2$ .



## ▼B

Tratamentul aplicat trebuie să corespundă celei mai mari rate de aplicare a produsului fitosanitar recomandate în instrucțiunile de utilizare și să poată fi încorporat uniform și la o adâncime adecvată în sol de exemplu în stratul <sup>(1)</sup> format de primii 10 cm de la suprafața solului. De exemplu, pentru substanțele chimice aplicate pe frunze sau pe sol care nu sunt încorporate în sol, adâncimea adecvată pentru calcularea cantității de substanță chimică de adăugat în fiecare balon este de 2,5 cm. Pentru substanțele chimice încorporate în sol, adâncimea adecvată este adâncimea de încorporare menționată în instrucțiunile de utilizare. Pentru substanțele chimice obișnuite, doza aplicată se estimează având în vedere cea mai relevantă cale de intrare; de exemplu, dacă cea mai relevantă cale de intrare în sol este prin nămoluri de epurare, substanța chimică se dozează în nămol într-o concentrație egală cu concentrația anticipată din nămol, iar cantitatea de nămol adăugată în sol trebuie să fi egală cu cantitatea de nămol adăugată în mod obișnuit în solurile agricole. Dacă această concentrație nu este suficient de ridicată pentru identificarea principalilor produși de transformare, este utilă incubarea unor probe de sol separate care conțin rate mai mari de substanță, dar trebuie evitate ratele excesive care influențează funcțiile microbiene ale solului (a se vedea punctele 1.5 și 1.8.2).

Ca alternativă, se poate trata un lot mai mare de sol (1-2 kg) cu substanța de testat, amestecându-se bine într-un malaxor adecvat, și se transferă părți mici de 50-200 g în baloane de incubare (de exemplu cu ajutorul unor repartitoare de probe). Se analizează părți alicote mici (de exemplu de 1 g) din lotul de sol tratat pentru a verifica dacă repartizarea substanței de testat este uniformă. Această procedură este preferabilă, deoarece permite o repartizare mai uniformă a substanței de testat în sol.

Se incubează și probe de sol netratate în aceleași condiții (aerobe) ca și probele tratate cu substanța de testat. Aceste probe se utilizează pentru măsurarea biomasei pe parcursul studiilor și la finalul acestora.

Dacă substanța de testat se aplică pe sol dizolvată în unul sau mai mulți solvenți organici, se incubează probe de sol tratate cu aceeași cantitate de solvent sau solvenți în aceleași condiții (aerobe) ca și probele tratate cu substanța de testat. Aceste probe se folosesc pentru măsurarea biomasei la începutul, în timpul și la finalul studiilor pentru a se verifica efectele solventului sau solvenților asupra biomasei microbiene.

Baloanele care conțin sol tratat se conectează la un sistem cu circulație continuă de tipul celui descris în figura 1 sau se închid cu o coloană de absorbție de tipul celei prezentate în figura 2 (a se vedea appendicele 3).

<sup>(1)</sup> Calculul concentrației inițiale în funcție de suprafață se realizează pe baza următoarei ecuații:

$$C_{\text{sol}} [\text{mg/kg}_{\text{sol}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{sol}}/\text{m}^3]}$$

$C_{\text{sol}}$  = Concentrația inițială din sol [ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]

A = Rata de aplicare [ $\text{mg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ]; l = grosimea stratului de sol [m]; d = densitatea aparentă a solului uscat [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ]. Ca regulă generală, o rată de aplicare de 1  $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  determină o concentrație de aproximativ 1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  într-un strat de 10 cm (presupunând că densitatea aparentă este de  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

**▼B****1.9.3. Prelevare de probe și măsurători**

Se scot baloane de incubare duplicat la intervale adecvate și se extrag probele de sol cu ajutorul unor solvenți adecvați cu polaritate diferită și se analizează în vederea măsurării substanței de testat și/sau a produșilor de transformare. Un studiu bine proiectat include suficiente baloane pentru ca două dintre acestea să poată fi sacrificate la fiecare prelevare. De asemenea, se scot soluții de absorbție sau materiale solide de absorbție la diferite intervale de timp (la intervale de 7 zile în prima lună, iar apoi la intervale de 17 zile) pe parcursul și la sfârșitul perioadei de incubare a fiecărei probe de sol și se analizează produșii volatili. De altfel, pe lângă proba de sol prelevată direct după aplicare (proba din ziua 0) trebuie să mai existe cel puțin 5 puncte suplimentare de prelevare. Intervalele de timp se aleg astfel încât să se poată determina modelul de epuizare pentru substanța de testat și modelele de formare și de epuizare a produșilor de transformare (de exemplu zilele 0, 1, 3, 7; 2, 3 săptămâni; 1, 2, 3 luni etc.).

Dacă substanța de testat este marcată cu  $^{14}\text{C}$ , radioactivitatea neextractibilă se cuantifică prin combustie și se calculează un bilanț masic pentru fiecare interval de prelevare.

În cazul incubării anaerobe sau în mediu de orezărie, faza de sol și faza apoasă se analizează împreună în vederea măsurării substanței de testat, iar produșii de transformare se separă prin filtrare sau centrifugare înainte de extracție și de analizare.

**1.9.4. Teste facultative**

Studiile aerobe nesterile la alte temperaturi și umidități ale solului pot fi utile pentru estimarea influenței temperaturii și umidității solului asupra ratelor de transformare a unei substanțe de testat și/sau a produșilor de transformare ai acestora din sol.

Se poate încerca realizarea unei caracterizări suplimentare a radioactivității neextractibile utilizându-se, de exemplu, extracția cu un lichid supercritic.

**2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Cantitățile de substanță de testat, de produși de transformare, de substanțe volatile (exprimate numai în %) și de produși neextractibili se exprimă ca % din concentrația inițială aplicată și, dacă este cazul, ca  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de sol (ca greutate uscată a solului) pentru fiecare interval de prelevare. Se furnizează și un bilanț masic exprimat ca procent din concentrația aplicată inițial pentru fiecare interval de prelevare. Reprezentarea grafică a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp permite estimarea timpului de înjumătățire al transformării sau  $\text{DT}_{50}$ . Se identifică principalii produși de transformare, iar concentrațiile acestora se reprezintă în funcție de timp astfel încât să fie ilustrate ratele de formare și de epuizare ale acestora. Este produs principal de transformare orice produs care reprezintă > 10 % din doza aplicată în orice moment de pe parcursul studiului.

Produsele volatile captate oferă indicații privind potențialul volatil al substanței de testat și produșii de transformare ai acestora din sol.

**▼B**

Timpul de înjumătățire sau valorile  $DT_{50}$  și, dacă este cazul, valorile  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$  se pot determina cu mai multă precizie utilizându-se metode de calcul bazate pe modele cinetice adecvate. Durata timpului de înjumătățire și valorile  $DT_{50}$  sunt incluse în raport, împreună cu o descriere a modelului cinetic utilizat, cu ordinul cineticii și cu coeficientul de determinare ( $r^2$ ). Este preferabilă cinetica de prim ordin, cu excepția cazurilor în care  $r^2 < 0,7$ . Dacă este cazul, calculele se aplică și principalilor produși de transformare. Referințele 31-35 conțin exemple de modele adecvate.

În cazul studiilor privind ratele de transformare realizate la diferite temperaturi, acestea sunt descrise în funcție de temperatură în cadrul intervalului experimental de temperatură cu ajutorul relației lui Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ sau } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

unde  $\ln A$  și  $B$  sunt constantele de regresie, respectiv segmentul și panta dreptei de interpolare determinate de regresia liniară a  $\ln k$  față de  $1/T$ , unde  $k$  este constanta de viteză la temperatura  $T$ , iar  $T$  este temperatura în grade Kelvin. Dacă transformarea depinde de activitatea microbiană, trebuie acordată o atenție specială intervalului limitat de temperaturi în care se aplică relația Arrhenius.

## 2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Deși studiile se realizează într-un sistem artificial de laborator, rezultatele permit estimarea ratei de transformare a substanței de testat, precum și rata de formare și de epuizare a produșilor de transformare în condiții de teren (36) (37).

Studiile asupra căilor de transformare a unei substanțe de testat oferă informații privind modul în care structura substanței aplicate se modifică în sol prin reacții chimice și microbiene.

## 3. RAPORT

### RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

- denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală [indicându-se poziția marcajului (marcajelor) radioactiv(e) dacă se folosește material marcat radioactiv] și proprietățile fizice și chimice relevante (a se vedea punctul 1.5);
- puritatea (impuritățile) substanței de testat;
- puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

Substanțe de referință:

- denumirea chimică și structura substanțelor de referință utilizate pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare.

Solurile de testare:

- detalii privind locul de colectare;
- data și procedura de prelevare a solului;

**▼B**

- proprietățile solului cum sunt pH-ul, conținutul de carbon organic, textura ( % nisip, % aluviuni, % argilă), capacitatea de schimb de cationi, densitatea aparentă, caracteristicile de reținere a apei și biomasa microbiană;
- durata depozitării solului și condițiile de depozitare (dacă este depozitat).

## Condiții de testare:

- datele la care au fost realizate studiile;
- cantitatea de substanță de testat aplicată;
- solvenții utilizați și metoda de aplicare a substanței de testat;
- greutatea solului tratat inițial și prelevat la fiecare interval în vederea analizei;
- descrierea sistemului de incubare utilizat;
- debitul de aer (numai pentru sistemele cu circulație continuă);
- temperatura la începutul experimentului;
- conținutul de umiditate din sol pe parcursul incubării;
- biomasa microbiană inițială, de pe parcursul derulării și de la sfârșitul studiilor aerobe și în condiții de orezărie;
- pH-ul, concentrația de oxigen și potențialul redox inițiale, de pe parcursul derulării și de la sfârșitul studiilor aerobe și în condiții de orezărie;
- metoda (metodele) de extracție;
- metodele de identificare și de cuantificare a substanței de testat și principalii produși de transformare din sol și materialele de absorbție;
- numărul de duplicate și de probe martor.

## Rezultate:

- rezultatul determinării activității microbiene;
- repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;
- ratele de recuperare (procentele acceptabile pentru ca un studiu să fie considerat valabil sunt prezentate la punctul 1.7.1);
- tabelul rezultatelor exprimate ca % din doza inițială aplicată și, dacă este cazul, în  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de sol (greutate uscată);
- bilanțul masic de pe parcursul și de la începutul studiilor;
- cuantificarea  $\text{CO}_2$  degajat și a altor compuși volatili;
- grafice ale concentrațiilor substanței de testat din sol în funcție de timp și, dacă este cazul, grafice pentru produșii importanți de transformare;
- timpul de înjumătățire sau  $\text{DT}_{50}$ ,  $\text{DT}_{75}$  și  $\text{DT}_{90}$  pentru substanța de testat și, dacă este cazul, pentru produșii principali de transformare, inclusiv pragurile de încredere;

**▼B**

- estimarea ratei de degradare abiotică în condiții sterile;
- o evaluare a cineticii de transformare a substanței de testat și, dacă este cazul, a principalilor produși de transformare;
- căile de transformare propuse, dacă este cazul;
- discutarea și interpretarea rezultatelor;
- date brute (de exemplu cromatogramele probelor, calculele privind viteza de transformare a probelor și mijloacele utilizate pentru identificarea produșilor de transformare).

#### 4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
2. Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
3. Uniunea Europeană (UE) (1995). Directiva 95/36/CE din 14 iulie 1995 de modificare a Directivei 91/414/CEE a Consiliului privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare, anexa II partea A și anexa III partea A: Transformarea și comportamentul în mediu.
4. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
5. BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
6. ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
7. ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
8. SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
9. MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
10. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
11. Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
12. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
13. T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
14. OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

## ▼B

15. ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
16. Anexa V la Directiva 67/548/CEE.
17. Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.
18. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
19. *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
20. *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
21. ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
22. Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
23. Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
24. Anderson, J. P. E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, p. 215-221.
25. ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
26. Anderson, J. P. E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, p. 45-60.
27. Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticides*, p. 105-120.
28. Keuken O., Anderson J. P. E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, p. 59-63 (SETAC-Europe).
29. Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, p. 68-69 (SETAC-Europe).
30. Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, p. 197-200.
31. Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, p. 141-146.

**▼B**

32. Hamaker, J. W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.
33. Goring, C. A. I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R. W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides”. R. Haque and V. H. Freed, Eds., p. 135-172.
34. Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.
35. Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.
36. Gustafson D. I., Holden L. R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.
37. Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.



## Apendicele 1

### SUCȚIUNEA, CAPACITATEA CÂMPULUI (FC) ȘI CAPACITATEA DE REȚINERE A APEI (WRC) <sup>(1)</sup>

| Înălțimea coloanei de apă<br>[cm] | pF <sup>(a)</sup> | Bari <sup>(b)</sup> | Observații   |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------|--|
| 10 <sup>7</sup>                   | 7                 | 10 <sup>4</sup>     | Sol uscat  |
| 1,6 · 10 <sup>4</sup>             | 4,2               | 16                  | Punct de ofilire                                   |
| 10 <sup>4</sup>                   | 4                 | 10                  |  |
| 10 <sup>3</sup>                   | 3                 | 1                   |  |
| 6 · 10 <sup>2</sup>               | 2,8               | 0,6                 |  |
| 3,3 · 10 <sup>2</sup>             | 2,5               | 0,33 <sup>(c)</sup> | Interval de capacități ale câmpului <sup>(d)</sup> |
| 10 <sup>2</sup>                   | 2                 | 0,1                 |  |
| 60                                | 1,8               | 0,06                |  |
| 33                                | 1,5               | 0,033               |  |
| 10                                | 1                 | 0,01                | Capacitate de reținere a apei (aproximativă)       |
| 1                                 | 0                 | 0,001               | Sol saturat de apă                                 |

<sup>(a)</sup> pF = log din valoarea coloanei de apă exprimate în cm.

<sup>(b)</sup> 1 bar = 10<sup>5</sup> Pa.

<sup>(c)</sup> Corespunde unui conținut aproximativ de apă de 10 % în nisip, de 35 % în aluviuni și de 45 % în argilă.

<sup>(d)</sup> Capacitatea câmpului nu este constantă, ci variază în funcție de tipul de sol de la pF 1,5 la 2,5.

*Sucțiunea* se măsoară în cm coloană de apă sau în bari. Deoarece intervalul valorilor sucțiunii este foarte mare, se exprimă simplu ca valoare pF, adică echivalentul logaritmului din valoarea coloanei de apă exprimată în cm.

*Capacitatea câmpului* se definește ca fiind cantitatea de apă care poate fi stocată, având în vedere gravitația, de un sol natural după 2 zile de la încheierea unei perioade lungi de ploaie sau după ce a fost irigat suficient. Se determină în sol nederanjat, *in situ*, pe câmp. Această măsurătoare nu se poate realiza pe probe de sol de laborator deranjat. Valorile FC determinate pentru soluri deranjate pot prezenta variații sistematice considerabile.

*Capacitatea de reținere a apei* (WHC) se determină în laborator pe soluri deranjate și nederanjate prin saturarea unei coloane de sol cu apă prin transport capilar. Este extrem de utilă pentru solurile deranjate și poate fi cu până la 30 % mai mare decât capacitatea câmpului (1). Se determină experimental mai ușor decât se determină valori FC fiabile.

vide

<sup>(1)</sup> Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.





## Apendicele 2

## Conținutul de umiditate (g de apă în 100 g sol uscat) al diferitelor tipuri de sol din diferite țări

| Tip de sol       | Țara          | Conținut de umiditate la |          |          |
|------------------|---------------|--------------------------|----------|----------|
|                  |               | WHC <sup>(1)</sup>       | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Nisip            | Germania      | 28,7                     | 8,8      | 3,9      |
| Nisip lutos      | Germania      | 50,4                     | 17,9     | 12,1     |
| Nisip lutos      | Elveția       | 44,0                     | 35,3     | 9,2      |
| Lut nisipos fin  | Elveția       | 72,8                     | 56,6     | 28,4     |
| Argilă lutoasă   | Brazilia      | 69,7                     | 38,4     | 27,3     |
| Argilă lutoasă   | Japonia       | 74,4                     | 57,8     | 31,4     |
| Argilă nisipoasă | Japonia       | 82,4                     | 59,2     | 36,0     |
| Lut nisipos fin  | Statele Unite | 47,2                     | 33,2     | 18,8     |
| Argilă nisipoasă | Statele Unite | 40,4                     | 25,2     | 13,3     |

<sup>(1)</sup> Capacitate de reținere a apei.

▼ B

## Apendicele 3

Figura 1

Exemplu de aparat cu circulație continuă pentru studiul transformării substanțelor chimice în sol <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>

- |  |  |  |
|--|--|--|
| 1: supapă cu ac  | 4: flacon pentru metabolismul solului (saturat cu apă numai în condiții anaerobe și de sol de orezârie;) | 6: dispozitiv cu acid sulfuric pentru captarea compușilor alcalini volatili                          |
| 2: sticlă de spălare cu gaz care conține apă                             | 5: dispozitiv cu etilen glicol pentru captarea compușilor organici volatili                              | 7, 8: dispozitiv cu hidroxid de sodiu pentru captarea CO <sub>2</sub> și a compușilor acizi volatili |
| 3: ultramembrană (numai în condiții sterile), dimensiunea porilor 0,2 μm |  | 9: debitmetru.   |

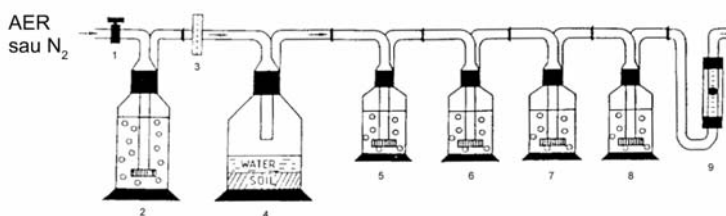
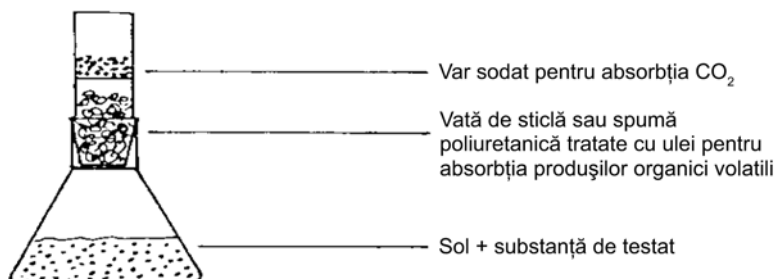


Figura 2

Exemplu de balon de tip biometric pentru studiul transformării substanțelor chimice în sol <sup>(3)</sup>



<sup>(1)</sup> Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 123-157.

<sup>(2)</sup> Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

<sup>(3)</sup> Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

**▼B****C.24. TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SISTEMELE DE SEDIMENTE ACVATICE****1. METODĂ**

Această metodă de testare reia Orientarea 308 (2002) a OCDE.

**1.1. INTRODUCERE**

Substanțele chimice pot intra în apele de suprafață puțin adânci sau foarte adânci pe căi cum sunt aplicarea directă, pierderile la vaporizare, scurgerile, drenarea, eliminarea deșeurilor, efluenții industriali, menajeri sau agricoli și depunerile atmosferice. Această metodă de testare reia o metodă de laborator elaborată pentru măsurarea transformărilor aerobe și anaerobe ale substanțelor chimice din sedimentele acvatice. Se bazează pe liniile directoare existente (1) (2) (3) (4) (5) (6). Numărul și tipul sedimentelor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (7). În cadrul atelierului de lucru au fost de asemenea formulate recomandări privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sedimente bazate pe liniile directoare ISO (8). Aceste studii sunt necesare pentru substanțele chimice introduse direct în apă sau care ar putea ajunge în mediul acvatic pe căile descrise anterior.

Faza apoasă superioară a sistemelor naturale de sedimente acvatice asigură de obicei condiții aerobe. Stratul de sediment de la suprafață poate fi atât aerob, cât și anaerob, dar în adâncime sedimentele sunt în general anaerobe. Pentru a reflecta toate aceste posibilități, prezentul document descrie atât teste aerobe, cât și teste anaerobe. Testul aerob constă din simularea unei coloane aerobe de apă peste un strat aerob de sediment și un substrat cu gradient anaerob. Testul anaerob simulează un sistem apă-sediment complet anaerob. Dacă situația impune devieri semnificative de la aceste recomandări, de exemplu prin utilizarea de carote de sediment intact sau de sedimente care este posibil să fi fost expuse la substanța de testat, pot fi utilizate alte metode (9).

**1.2. DEFINIȚII**

Se folosesc întotdeauna unitățile standard internaționale (SI).

**Substanță de testat:** orice substanță, indiferent dacă este vorba despre substanța mamă sau despre produșii de transformare relevanți.

**Produși de transformare:** toate substanțele rezultate din reacțiile biotice sau abiotice de transformare a substanței de testat, în special CO<sub>2</sub> și reziduurile legate.

**Reziduuri legate:** „reziduurile legate” sunt compuși vegetali sau animalii din sol, care persistă în matrice după extracție sub forma substanței mamă sau a metabolitului (metaboliților) acesteia. Metoda de extracție nu trebuie să modifice considerabil compoziția înșiși sau structura matricei. Natura legăturii poate fi determinată parțial prin metode de extracție care modifică matricea și prin tehnici analitice complexe. Până în prezent a fost identificată în acest mod natura legăturilor covalente, ionice, de sorbție și de captare. În general, formarea reziduurilor legate reduce bioaccesibilitatea și biodisponibilitatea în mod considerabil (10) [modificare IUPAC 1984 (11)].

**▼B**

**Transformare aerobă:** (oxidare): reacție care se produce în prezența oxigenului molecular (12).

**Transformare anaerobă:** (reducere): reacție care se produce în absența oxigenului molecular (12).

**Ape naturale:** sunt apele de suprafață obținute din lacuri, râuri, fluvii etc.

**Sediment:** este un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceștia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu masă moleculară mare. Este depus de apele naturale și formează interfața cu acestea.

**Mineralizare:** este degradarea completă a unui compus organic în  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  în condiții aerobe și în  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  în condiții anaerobe. În cadrul prezentei metode de test, dacă se folosește un compus marcat radioactiv, mineralizare înseamnă o degradare considerabilă pe parcursul căreia un atom de carbon marcat este oxidat sau redus cantitativ, degajându-se o cantitate adecvată de  $^{14}\text{CO}_2$  sau respectiv de  $^{14}\text{CH}_4$ .

**Timp de înjumătățire:**  $t_{0,5}$  este timpul necesar pentru transformarea a 50 % dintr-o substanță de testat în cazul transformărilor care pot fi descrise printr-o cinetică de prim ordin; nu depinde de concentrația inițială.

**DT<sub>50</sub> (timp de degradare 50):** este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 50 %.

**DT<sub>75</sub> (timp de degradare 75):** este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 75 %.

**DT<sub>90</sub> (timp de degradare 90):** este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 90 %.

### 1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Pentru identificarea și cuantificarea produșilor prin metode spectroscopice și cromatografice se folosesc substanțe de referință.

### 1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

Pentru măsurarea ratei de transformare se poate utiliza o substanță de testat marcată sau nemarcată, deși este preferabil materialul marcat. Materialul marcat este necesar pentru studierea căilor de transformare și pentru stabilirea bilanțului masic. Se recomandă marcarea cu  $^{14}\text{C}$  dar poate fi utilă și utilizarea altor izotopi cum sunt  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ . În măsura în care este posibil, marcajul se amplasează în partea sau părțile cele mai stabile ale moleculei<sup>(1)</sup>. Puriitatea chimică și/sau radiochimică a substanței de testat trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înainte de efectuarea unui test sunt necesare următoarele informații privind substanța de testat:

- (a) solubilitatea în apă (metoda A.6);
- (b) solubilitatea în solvenți organici;
- (c) presiunea vaporilor (metoda A.4) și constanta lui Henry;

<sup>(1)</sup> De exemplu, dacă substanța de testat conține un ciclu, acesta trebuie marcat; dacă substanța de testat conține două sau mai multe cicluri, este posibil să fie necesare studii separate pentru evaluarea evoluției fiecărui ciclu și pentru a obține informații fiabile privind formarea produșilor de transformare.

**▼B**

- (d) coeficientul de împărțire n-octanol/apă (metoda A.8);
- (e) coeficientul de adsorbție ( $K_d$ ,  $K_r$  sau  $K_{oc}$ , dacă este cazul) (metoda C.18);
- (f) hidroliza (metoda C.7);
- (g) constanta de disociere ( $pK_a$ ) [Orientarea 112 a OCDE] (13).

*Notă:* Se precizează și temperatura la care au fost efectuate aceste măsurători.

Este posibil să fie utile și informații privind toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor din sol, privind biodegradabilitatea imediată și/sau intrinsecă și date privind transformările aerobe și anaerobe din sol.

Trebuie să fie disponibile metode analitice (inclusiv metode de extracție și de purificare) necesare pentru cuantificarea și identificarea substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia din apă și din sedimente (a se vedea punctul 1.7.2).

#### 1.5. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

În cadrul metodei descrise se folosește un sistem de sedimente acvatice aerobe și anaerobe (a se vedea apendicele 1) care permite:

- (i) măsurarea ratei de transformare a substanței de testat într-un sistem apă-sediment;
- (ii) măsurarea ratei de transformare a substanței de testat într-un sediment;
- (iii) măsurarea ratei de mineralizare a substanței de testat și/sau a produșilor săi de transformare (dacă se folosește o substanță de testat marcată cu  $^{14}C$ );
- (iv) identificarea și cuantificarea produșilor de transformare din faza apoasă și din faza sedimentară și în special realizarea bilanțului masic (dacă se testează o substanță marcată);
- (v) măsurarea modului de repartizare a substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia între cele două faze pe parcursul unei perioade de incubare la întuneric (pentru a evita, de exemplu, proliferarea algelor) la o temperatură constantă. Timpul de înjumătățire, valorile  $DT_{50}$ ,  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$  se determină dacă datele permit acest lucru, dar nu trebuie extrapolate dincolo de perioada experimentală (a se vedea punctul 1.2).

Pentru studiul aerob și respectiv pentru studiul anaerob sunt necesare cel puțin două sedimente și fazele apoase asociate acestora (7). Cu toate acestea, este posibil ca în unele cazuri să fie necesară utilizarea a mai mult de două sedimente acvatice, de exemplu în cazul substanțelor care pot fi prezente în apă dulce și/sau în mediul marin.

**▼B****1.6. APLICABILITATEA TESTULUI**

Metoda se aplică tuturor substanțelor chimice (nemarcate sau marcate) pentru care se poate utiliza o metodă analitică cu o precizie și o sensibilitate suficientă. Se aplică pentru compuși ușor volatili, nevolatili, solubili sau insolubili în apă. Testul nu se aplică substanțelor chimice puternic volatile în apă (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care de aceea nu pot fi menținute în apă și/sau în sedimente în condițiile experimentale din cadrul acestui test.

Metoda a fost utilizată până în prezent pentru studierea transformării substanțelor chimice în ape dulci și în sedimente, dar în principiu poate fi aplicată și sistemelor de estuar/marine. Metoda nu este adecvată pentru simularea condițiilor din ape curgătoare (de exemplu din râuri) sau din largul mării.

**1.7. CRITERII DE CALITATE****1.7.1. Recuperare**

Extracția și analizarea probelor de apă și de sediment, cel puțin în duplicat, imediat după adăugarea substanței de testat, oferă o primă indicație privind repetabilitatea metodei analitice și uniformitatea procedurii de aplicare a substanței de testat. Ratele de recuperare din etapele ulterioare ale experimentelor sunt furnizate de bilanțurile masice respective (dacă se folosește material marcat). Ratele de recuperare variază între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate (6) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate.

**1.7.2. Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea unei analize duplicat pe același extract de apă sau de sediment, incubat suficient timp pentru a se forma produșii de transformare.

Pragul de detecție (LOD) a substanței de testat și a produșilor de transformare din cadrul metodei de analiză trebuie să fie de cel puțin  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (substanță de testat) în apă sau în sediment sau de 1 % din doza inițială aplicată, respectiv valoarea mai mică dintre acestea. Se precizează și pragul de cuantificare (LOQ).

**1.7.3. Precizia datelor privind transformarea**

Analiza de regresie a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp oferă informații adecvate privind fiabilitatea curbei de transformare și permite calcularea pragurilor de încredere pentru timpii de înjumătățire (în cazurile de cinetică de pseudo prim ordin) sau a valorilor  $DT_{50}$  și, dacă este cazul, a valorilor  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$ .

**1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.8.1. Sistemul și aparatura de testare**

Studiul se realizează în recipiente de sticlă (de exemplu sticle, tuburi de centrifugare), cu excepția cazurilor în care informațiile preliminare (coeficientul de împărțire n-octanol/apă, datele privind sorbția etc.) arată că este posibil ca substanța de testat să adere la sticlă, caz în care se poate lua în considerare utilizarea unui alt material (de exemplu Teflon). Dacă se știe că substanța de testat aderă la sticlă, problema poate fi evitată cu ajutorul uneia sau al mai multora dintre următoarele metode:

**▼B**

- determinarea masei de substanță de testat și/sau de produși de transformare ai acestora absorbiți pe sticlă;
- spălarea tuturor vaselor de sticlă cu solvent la sfârșitul testului;
- utilizarea unor produse preparate (a se vedea și punctul 1.9.2);
- utilizarea unei cantități mai mari de co-solvent pentru adăugarea substanței de testat în sistem; dacă se folosește un co-solvent, acesta trebuie să nu producă o reacție de solvoliză a substanței de testat.

În appendicele 2 și 3 și în referința 14 sunt prezentate exemple de aparatură de testare tipică (sisteme cu flux continuu și de tip biometru). Alte sisteme utile de incubare sunt descrise la referința 15. Aparatura de experiment trebuie să permită schimbul de aer sau de azot și captarea produșilor volatili. Dimensiunile aparaturii trebuie să permită îndeplinirea cerințelor de testare (a se vedea punctul 1.9.1). Ventilarea se poate realiza fie prin barbotare ușoară, fie prin trecerea de aer sau de azot pe suprafața apei. În al doilea caz se recomandă amestecarea ușoară la suprafața apei pentru obținerea unei mai bune repartizări a oxigenului sau a azotului în apă. Nu se va utiliza aer fără CO<sub>2</sub>, deoarece acesta poate provoca o creștere a pH-ului apei. În ambele cazuri, deranjarea sedimentului trebuie evitată în cea mai mare măsură posibil. Substanțele chimice puțin volatile se testează într-un sistem de tip biometru prin amestecarea ușoară a apei de la suprafață. Pentru captarea produșilor volatili se pot utiliza, de asemenea, recipiente închise, cu un spațiu liber umplut fie cu aer atmosferic fie cu azot, și fiole interne (16). În cadrul testelor anaerobe este necesar un schimb regulat de gaz la suprafață pentru compensarea consumului de oxigen de către biomasa.

Pentru captarea produșilor volatili de transformare se pot utiliza, dar nu în mod limitativ, următoarele dispozitive: soluții de 1 mol·dm<sup>-3</sup> de hidroxid de potasiu sau de hidroxid de sodiu pentru dioxidul de carbon <sup>(1)</sup> și etilen glicol, etanolamină sau parafină 2 % în xilen pentru compuși organici. Produșii volatili formați în condiții anaerobe, cum este metanul, se pot recupera, de exemplu cu ajutorul sitelor moleculare. Acești produși volatili se pot arde, de exemplu până la CO<sub>2</sub>, prin trecerea gazului printr-un tub cu cuarț umplut cu CuO la o temperatură de 900 °C și captarea CO<sub>2</sub> format într-o coloană de absorbție conținând produși alcalini (17).

Sunt necesare instrumente de laborator pentru analiza chimică a substanței de testat și a produșilor de transformare [cromatografie în fază gazoasă sau lichidă (GLC), cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografie în strat subțire (TLC), spectroscopie de masă (MS), cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS), cromatografie în fază lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS), rezonanță magnetică nucleară (RMN) etc.] precum și, dacă este cazul, dispozitive de detectare a substanțelor chimice marcate radiologic sau nemarcate. Dacă se folosesc substanțe marcate radioactiv, sunt de asemenea necesare un contor de scintilație lichid și un aparat de oxidare pentru combustie (pentru combustia probelor de sediment înainte de analizarea radioactivității).

Pot fi necesare și alte echipamente standard de laborator pentru realizarea analizelor fizico-chimice și biologice (a se vedea tabelul 1 punctul 1.8.2.2), precum și sticlărie, substanțe chimice și reactivi.

<sup>(1)</sup> Întrucât aceste soluții alcaline de absorbție absorb atât dioxidul de carbon din aerul utilizat pentru ventilație, cât și pe cel produs prin respirație în cadrul experiențelor aerobe, acestea trebuie înlocuite la intervale regulate pentru a evita saturarea lor și în consecință pierderea capacității de absorbție.

**▼B****1.8.2. Selectarea și numărul de sedimente acvatice**

Locurile de prelevare se selectează în funcție de finalitatea testului în fiecare caz în parte. Pentru alegerea locurilor de prelevare trebuie avut în vedere istoricul eventualelor aporturi de natură agricolă, industrială sau menajeră în bazinul de captare și în apele din amonte. Nu se folosesc sedimente contaminate cu substanța de testat sau cu produși cu structură analogă pe parcursul ultimilor 4 ani.

**1.8.2.1. Selectarea sedimentelor**

Pentru studiile aerobe se folosesc de obicei două sedimente (7). Cele două sedimente selectate trebuie să fie diferite în ceea ce privește textura și conținutul de carbon organic. Un sediment trebuie să aibă un conținut ridicat de carbon organic (2,5-7,5 %) și textură fină, iar celălalt trebuie să aibă un conținut scăzut de carbon organic (0,5-2,5 %) și o textură grosieră. Diferența dintre conținuturile de carbon organic trebuie să fie de cel puțin 2 %. Prin „textură fină” se înțelege un conținut de [argilă + aluviuni] <sup>(1)</sup> > 50 %, iar prin „textură grosieră” se înțelege un conținut de [argilă + aluviuni] < 50 %. Diferența dintre conținuturile de [argilă + aluviuni] ale sedimentelor trebuie să fie în mod normal mai mare sau egală cu 20 %. Dacă este posibil ca o substanță chimică să ajungă și în ape marine, cel puțin unul dintre cele două sisteme apă-sediment trebuie să fie de origine marină.

Pentru studiile strict anaerobe se prelevează două probe de sediment (precum și faza apoasă asociată) din zonele anaerobe ale sistemelor de ape de suprafață (7). Sedimentele și fazele apoase se manipulează și se transportă cu atenție, evitându-se orice contact cu oxigenul.

Și alți parametri pot fi importanți pentru selectarea sedimentelor și trebuie avuți în vedere în fiecare caz în parte. De exemplu, pH-ul sedimentelor este important pentru testarea substanțelor chimice a căror transformare și/sau sorbție pot să depindă de pH. Dependența sorbției de pH poate fi provocată de pKa a substanței de testat.

**1.8.2.2. Caracteristicile probelor de apă-sediment**

Parametrii de importanță cheie care se măsoară și se notează în raport (precizându-se metoda utilizată) pentru apă și sediment, precum și etapa testului în care trebuie determinați sunt prezentate în rezumat în tabelul următor. Referințele (18) (19) (20) (21) conțin informații privind metodele de determinare a acestor parametri.

În plus, trebuie măsurați și înregistrați și alți parametri, după caz [pentru apă dulce: particule, alcalinitate, duritate, conductivitate, NO<sub>3</sub>/PO<sub>4</sub> (raporturi și valori individuale); pentru sedimente: capacitatea de schimb de cationi, capacitatea de reținere a apei, carbonat, azot și fosfor total; pentru sisteme marine: salinitatea]. Și analiza sedimentelor și a apei în vederea identificării nitratului, sulfatului și a fierului biodisponibil precum și a altor primitori de electroni poate fi utilă pentru evaluarea condițiilor redox, în special în ceea ce privește transformările anaerobe.

<sup>(1)</sup> [Argilă + aluviuni] este fracțiunea minerală a sedimentului cu dimensiuni ale particulelor < 50 μm.




**Măsurarea parametrilor caracteristici probelor apă-sediment (7) (22) (23)**

| Parametru                             | Etapele procedurii de testare |                 |                          |                    |                       |                     |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
|                                       | prelevare pe teren            | post-manipulare | inițierea aclimată-zării | inițierea testului | pe parcursul testului | la finalul testului |
| <b>Apă</b>                            |                               |                 |                          |                    |                       |                     |
| Origine/sursă                         | x                             |                 |                          |                    |                       |                     |
| Temperatură                           | x                             |                 |                          |                    |                       |                     |
| pH                                    | x                             |                 | x                        | x                  | x                     | x                   |
| COT                                   |                               |                 | x                        | x                  |                       | x                   |
| Concentrație de O <sub>2</sub> (*)    | x                             |                 | x                        | x                  | x                     | x                   |
| Potențial redox (*)                   |                               |                 | x                        | x                  | x                     | x                   |
| <b>Sediment</b>                       |                               |                 |                          |                    |                       |                     |
| Origine/sursă                         | x                             |                 |                          |                    |                       |                     |
| Adâncimea stratului                   | x                             |                 |                          |                    |                       |                     |
| pH                                    |                               | x               | x                        | x                  | x                     | x                   |
| Repartizarea dimensiunii particulelor |                               | x               |                          |                    |                       |                     |
| COT                                   |                               | x               | x                        | x                  | x                     | x                   |
| Biomasă microbiană (**)               |                               | x               |                          | x                  |                       | x                   |
| Potențial redox (*)                   | Observație (culoare/miros)    |                 | x                        | x                  | x                     | x                   |

(\*) Conform rezultatelor cercetărilor recente, măsurarea concentrațiilor de oxigen din apă și a potențialului redox nu au nici valoare mecanică, nici valoare predictivă în ceea ce privește creșterea și dezvoltarea coloniilor microbiene în apele de suprafață (24) (25). Determinarea consumului biochimic de oxigen (la prelevare, la începutul și la sfârșitul testului) și a concentrațiilor micro/macro elementelor nutritive Ca, Mg și Mn (la începutul și la sfârșitul testului) în apă și măsurarea N total și P total în sedimente (la prelevare și la sfârșitul testului) pot constitui instrumente mai bune de interpretare și de evaluare a ratelor și a căilor de biotransformare aerobă.

(\*\*) Metoda ratei de respirație microbiene (26), metoda fumigării (27) sau măsurători numerice (bacterii, actinomicete, ciuperci și total colonii) pentru studiile aerobe; rata metanogenezei pentru studiile anaerobe.

**1.8.3. Colectarea, manipularea și depozitarea**
**1.8.3.1 Colectarea**

Pentru prelevarea de probe de sediment se folosește proiectul de linie directoare ISO privind prelevarea sedimentelor de fund (8). Probele de sediment se prelevează din întregul strat superior de 5-10 cm de sediment. Apa asociată se colectează din același loc și în același timp ca și sedimentele. Pentru studiile anaerobe, sedimentele și apa asociată se prelevează și se transportă evitându-se orice contact cu oxigenul (28) (a se vedea punctul 1.8.2.1). Câteva dintre dispozitivele de prelevare sunt descrise în literatură (8) (23).

**▼B****1.8.3.2 Manipulare**

Sedimentul se separă de apă prin filtrare și se trece printr-o sită de 2 mm utilizându-se apa în exces prelevată din același loc, care apoi se elimină. Se amestecă în proporția dorită cantități cunoscute de sedimente și de apă (a se vedea punctul 1.9.1) în flacoane de incubare și se prepară pentru perioada de aclimatizare (a se vedea punctul 1.8.4). În cazul studiului anaerobic, toate etapele de manipulare se efectuează în absența oxigenului (29) (30) (31) (32) (33).

**1.8.3.3 Depozitare**

Este preferabil ca probele de sediment și apă utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren, dar dacă este necesară depozitarea, sedimentul și apa se cern după cum s-a arătat anterior și se depozitează împreună, sub apă (sub un strat de apă de 6-10 cm), la întuneric, la temperaturi de  $4 \pm 2$  °C timp de maximum 4 săptămâni (7) (8) (23). Probele destinate studiilor aerobe se depozitează astfel încât să beneficieze de un acces nestingherit al aerului (de exemplu în recipiente deschise), iar probele destinate studiilor anaerobe se depozitează în absența oxigenului. Sedimentele și apa nu trebuie să înghețe sau să se usuce în timpul transportului și al depozitării.

**1.8.4. Pregătirea probelor de sediment/apă pentru test**

Înainte de a se adăuga substanța de testat este necesară o perioadă de aclimatizare, pe parcursul căreia fiecare probă de sediment/apă se introduce în recipientul de incubare utilizat pentru testul principal, iar aclimatizarea se realizează exact în aceleași condiții ca și incubarea din cadrul testului (a se vedea punctul 1.9.1). Perioada de aclimatizare reprezintă timpul necesar pentru atingerea unei stabilități suficiente a sistemului în ceea ce privește pH-ul, concentrația de oxigen în apă, potențialul redox al sedimentului și al apei și separarea macroscopică a fazelor. Perioada de aclimatizare durează de obicei între una și două săptămâni și nu mai mult de patru săptămâni. Rezultatul determinărilor realizate pe parcursul acestei perioade se înregistrează.

**1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI****1.9.1. Condiții de testare**

Testul se efectuează într-un dispozitiv de incubare (a se vedea punctul 1.8.1) utilizându-se un raport al volumelor de apă și de sediment între 3:1 și 4:1 și un strat de sediment de 2,5 cm ( $\pm 0,5$  cm)<sup>(1)</sup>. Se recomandă utilizarea unei cantități de minimum 50 g sediment (greutate uscată) pentru fiecare recipient de incubare.

Testul se realizează la întuneric, la o temperatură constantă din intervalul 10-30 °C. Temperatura recomandată este de  $(20 \pm 2)$  °C. Dacă este cazul, se pot utiliza temperaturi mai scăzute (de exemplu 10 °C), în funcție de informațiile care trebuie obținute prin test. Temperatura de incubare se controlează și se înregistrează.

<sup>(1)</sup> Studii recente au arătat că depozitarea la 4 °C poate determina o scădere a conținutului de carbon organic din sediment care poate duce la reducerea activității microbiene (34).

**▼B****1.9.2. Tratarea și aplicarea substanței de testat**

Se folosește o singură concentrație a substanței de testat<sup>(1)</sup>. Pentru produsele fitosanitare aplicate direct în mediul acvatic, se folosește doza maximă indicată în instrucțiunile de utilizare ca rată maximă de aplicare, iar calculele se efectuează având în vedere suprafața de apă din recipientul de test. În toate celelalte cazuri, concentrația care trebuie utilizată se bazează pe estimările privind emisiile din mediu. Concentrația de substanță de testat aplicată trebuie să fie adecvată pentru caracterizarea căii de transformare și a formării și epuizării produșilor de transformare. Este posibil să fie necesară aplicarea unor doze mai mari (de exemplu de 10 ori) în cazurile în care concentrațiile substanței de testat sunt apropiate de limita de detecție la începutul studiului și/sau dacă principalii produși de transformare nu au putut fi detectați cu ușurință la o rată egală cu 10 % din rata de aplicare a substanței de testat. Cu toate acestea, dacă se folosesc concentrații mai mari ale substanței de testat, acestea nu trebuie să aibă un efect advers important asupra activității microbiene din sistemul apă-sediment. Pentru obținerea unei concentrații constante a substanței de testat în recipiente de diferite dimensiuni, poate fi indicată ajustarea cantității de produs aplicat în funcție de adâncimea coloanei de apă din recipient față de adâncimea apei de pe teren (care se presupune a fi de 100 cm, dar se pot utiliza și alte valori). Pentru un exemplu de calcul, a se vedea apendicele 4.

Teoretic, substanța de testat se aplică sub forma unei soluții apoase în faza apoasă a sistemului testat. Dacă nu se poate proceda altfel, se pot utiliza cantități mici de solvenți miscibili în apă (cum sunt acetona sau etanolul) pentru repartizarea și aplicarea substanței de testat, dar aceștia nu trebuie să depășească 1 % v/v și nu trebuie să aibă efecte adverse asupra activității microbiene a sistemului de testare. Soluția apoasă de substanță de testat se prepară cu atenție – pentru a asigura o omogenizare totală se poate efectua o amestecare prealabilă cu ajutorul coloanelor de generator. După adăugarea soluției apoase în sistemul de testare se recomandă amestecarea ușoară a fazei apoase dar deranjând sedimentele cât mai puțin posibil.

În mod obișnuit nu se recomandă utilizarea de produse preparate, deoarece ingredientele preparate pot afecta repartizarea substanței de testat și/sau a produșilor de transformare între faza apoasă și faza sedimentară. Cu toate acestea, în cazul substanțelor puțin solubile în apă, utilizarea de materiale preparate poate constitui o alternativă adecvată.

Numărul de recipiente de incubare depinde de numărul de prelevări (a se vedea punctul 1.9.3). Trebuie prevăzut un număr suficient de sisteme de testare, astfel încât două astfel de sisteme să poată fi sacrificate la fiecare prelevare. Dacă se folosesc unități martor pentru fiecare sistem de sedimente acvatice, acestea nu se tratează cu substanța de testat. Unitățile martor pot fi utilizate pentru determinarea biomasei microbiene din sediment și a carbonului organic total din apă și din sediment la finalul studiului. Două dintre unitățile martor (de exemplu o unitate de martor din fiecare sediment acvatic) pot fi utilizate pentru monitorizarea parametrilor necesari privind sedimentul și apa pe parcursul perioadei de aclimatizare (a se vedea tabelul din punctul 1.8.2.2). Dacă substanța de testat se aplică cu ajutorul unui solvent se adaugă doi martori suplimentari pentru măsurarea efectelor negative asupra activității microbiene din sistemul de testare.

<sup>(1)</sup> Efectuarea unui test pentru o a doua concentrație poate fi utilă pentru substanțele chimice care ajung în apele superficiale pe alte căi care determină concentrații considerabil diferite, în măsura în care concentrația cea mai mică poate fi analizată cu suficientă precizie.

**▼B****1.9.3. Durata testului și recoltarea probelor**

Durata experimentului nu trebuie să depășească în mod normal 100 de zile (6) și trebuie să se desfășoare până la stabilirea căilor de degradare și a profilului de repartizare apă/sediment sau până la disiparea a 90 % din substanța de testat prin transformare și/sau volatilizare. Trebuie efectuate cel puțin șase recoltări (inclusiv timpul zero) și se realizează un studiu facultativ preliminar (a se vedea punctul 1.9.4) pentru stabilirea regimului de recoltare și a duratei testului, cu excepția cazurilor în care sunt disponibile din studii anterioare suficiente date privind substanța de testat. Pentru substanțele hidrofobe poate fi necesară instituirea unor puncte suplimentare de prelevare pe parcursul perioadei inițiale pentru determinarea ratei de repartizare între faza apoasă și faza sedimentară.

La fiecare prelevare, se iau pentru analiză recipiente de incubare (duplicat). Sedimentul și apa care îl acoperă se analizează separat <sup>(1)</sup>. Se scoate cu atenție apa de la suprafață, evitându-se atingerea sedimentului. Extracția și caracterizarea substanței de testat și a produșilor de transformare se realizează în conformitate cu procedurile analitice adecvate. Se elimină materialele adsorbite pe pereții recipientului de incubare și în tuburile utilizate pentru captarea produșilor volatili.

**1.9.4. Testul preliminar opțional**

Dacă durata și regimul de prelevare a probelor nu pot fi estimate pe baza altor studii relevante asupra substanței de testat, poate fi adecvată efectuarea unui test preliminar în aceleași condiții ca și cele propuse pentru studiul definitiv. Dacă se efectuează acest test preliminar, se descriu pe scurt condițiile experimentale și rezultatele testului.

**1.9.5. Măsurători și analiză**

La fiecare prelevare se măsoară și se înregistrează concentrația substanței de testat și produșii de transformare din apă și din sediment (ca procent și concentrație de substanță aplicată). Ca regulă generală, se identifică toți produșii de transformare pentru care se detectează  $\geq 10$  % din radioactivitatea totală aplicată sistemului apă/sediment, indiferent de prelevare, cu excepția cazurilor în care există justificări rezonabile. Se identifică de asemenea produșii de transformare a căror concentrație crește constant pe durata studiului, chiar și în cazurile în care concentrațiile acestora nu depășesc limitele menționate anterior, deoarece este posibil ca acesta să fie un indiciu asupra persistenței. Procesul verbal trebuie să conțină justificări în acest sens.

Rezultatele privind sistemele de captare a gazelor/produșilor volatili (CO<sub>2</sub> și alții, de exemplu compuși organici volatili) se înregistrează la fiecare prelevare. Se înregistrează și ratele de mineralizare. La fiecare prelevare se menționează și reziduurile (legate) care nu pot fi extrase.

<sup>(1)</sup> În cazurile în care este posibil ca produșii rezultați din transformările anaerobe să se reoxideze foarte repede, se asigură condiții anaerobe și în timpul recoltării și al analizei.

**▼B****2. DATE****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se calculează bilanțul masic total și recuperarea (a se vedea punctul 1.7.1) radioactivității adăugate pentru fiecare prelevare. Rezultatele se înregistrează ca procent de radioactivitate adăugată. Repartizarea radioactivității între apă și sediment se înregistrează ca procent și concentrație pentru fiecare prelevare.

Se calculează timpii de înjumătățire, valorile  $DT_{50}$  și, dacă este cazul, valorile  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$ , precum și pragurile de încredere (a se vedea punctul 1.7.3). Se pot obține informații privind rata de disipare a substanței de testat în apă și în sediment cu ajutorul unor instrumente adecvate de evaluare. Acestea merg de la cinetica de pseudo-prim ordin, tehnici empirice de interpolare care folosesc soluții grafice sau numerice până la alte metode de evaluare care folosesc de exemplu modele cu unul sau mai multe compartimente. Literatura de specialitate conține detalii suplimentare în acest sens (35) (36) (37).

Toate abordările prezintă avantaje și inconveniente, iar complexitatea lor variază considerabil. Ipoteza unei cinetici de prim ordin constituie o simplificare excesivă a procesului de degradare și de repartizare dar, dacă se poate utiliza, oferă un termen (constanta vitezei sau timpul de înjumătățire) ușor de înțeles și foarte util pentru modelele de simulare și pentru calcularea concentrațiilor previzibile din mediu. Este posibil ca metodele empirice sau transformările liniare să producă o mai bună interpolare a curbilor și a datelor și să permită astfel o mai bună estimare a timpilor de înjumătățire, a valorilor  $DT_{50}$  și, dacă este cazul, a valorilor  $DT_{75}$  și  $DT_{90}$ . Cu toate acestea, utilizarea constantelor derivate este limitată. Modelele cu compartimente pot genera constante utile pentru evaluarea riscurilor care descriu viteza de degradare din diferitele compartimente și repartizarea substanței chimice. Acestea se folosesc în general pentru estimarea constantelor de viteză pentru formarea și transformarea principalilor produși de transformare. Metoda aleasă trebuie justificată în toate cazurile, iar experimentatorul trebuie să demonstreze grafic și/sau statistic calitatea de ajustare.

**3. RAPORT****3.1. RAPORT DE TESTARE**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală (indicându-se poziția marcajului dacă se folosește material marcat radioactiv) și proprietățile fizice și chimice relevante;

— puritatea (impuritățile) substanței de testat;

— puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea molară (dacă este cazul).

**▼B**

Substanțe de referință:

- denumirea chimică și structura substanțelor de referință utilizate pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare.

Sedimente și apă de testare:

- localizarea și descrierea locului/locurilor din care au fost prelevate sedimentele acvatice și, dacă este posibil, istoricul contaminării;
- orice informații privind recoltarea, depozitarea (dacă este cazul) și aclimatizarea sistemelor apă-sediment;
- caracterizarea probelor apă-sediment în conformitate cu tabelul din punctul 1.8.2.2.

Condiții de testare:

- sistemul de testare utilizat (cu circulație continuă, biometru, mod de ventilare, metodă de amestecare, volum de apă, masă sedimentară, grosime a stratului de apă și a stratului de sediment, dimensiunea recipientelor de testare etc.);
- aplicarea substanței de testat în sistemul de testare: concentrația de testare, numărul de duplicate și martori, modul de aplicare a substanței de testat (de exemplu utilizarea unui solvent, dacă este cazul) etc.;
- temperatura de incubare;
- număr de prelevări;
- metode de extracție, randamente și praguri de detecție și metode analitice;
- metode de caracterizare/identificare a produșilor de transformare;
- devierile de la protocolul de test sau de la condițiile de testare pe parcursul studiului.

Rezultate:

- date brute privind analizele reprezentative (toate datele brute se păstrează în arhivele BPL);
- repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;
- ratele de recuperare (valorile procentuale acceptabile pentru ca un studiu să fie considerat valabil sunt prezentate la punctul 1.7.1);
- tabelul rezultatelor exprimate ca % din doza aplicată și în  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  în apă, sedimente și în întregul sistem (numai %) din substanța de testat și, dacă este cazul, din produșii de transformare și din radioactivitatea neextractibilă;
- bilanțul masic de pe parcursul și de la începutul studiilor;
- reprezentări grafice ale transformării fracțiunilor apă/sediment și ale celor din întregul sistem (inclusiv mineralizarea);
- ratele de mineralizare;

**▼B**

- timpul de înjumătățire sau valorile DT<sub>50</sub>, DT<sub>75</sub> și DT<sub>90</sub> pentru substanța de testat și, dacă este cazul, pentru produșii principali de transformare, inclusiv pragurile de încredere în apă, sediment și în întregul sistem;
- o evaluare a cineticii de transformare a substanței de testat și, dacă este cazul, a principalilor produși de transformare;
- o cale de transformare propusă, dacă este cazul;
- discutarea rezultatelor.

#### 4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
2. Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
3. MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
4. Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.
5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
6. SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
7. OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
8. ISO/DIS 5667-12, (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
9. US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
10. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
11. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
12. OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
13. OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
14. Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

## ▼B

15. Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds.), Vol. 1, p. 85-114. J. Wiley & Sons.
16. Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, p. 631-637.
17. Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with <sup>14</sup>C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, p. 661-667.
18. Black, C. A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
19. APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17<sup>th</sup> edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
20. Rowell, D. L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*, Longman.
21. Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, p. 1038-1039.
22. SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests”, 3-4 July 1991.
23. SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
24. Vink, J. P. M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, p. 2858-2868.
25. Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* p. 329-338.
26. Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, p. 97-203.
27. ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
28. Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), p. 13-21.
29. Shelton, D. R. and Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Ap. Environ. Microbiol.* 47, p. 850-857.
30. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, p. 1527-1550.
31. Pagga, U. and Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, p. 1499-1509.



**▼B**

32. Nuck, B. A. and Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of  $^{14}\text{C}$ -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, p. 3597-3603.
33. US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
34. Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, p. 961-968.
35. Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, p.187 – 203.
36. Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, p. 47-60.
37. Carlton, R. R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, p. 1349-1354.

**▼B***Apendicele 1***INFORMAȚII PRIVIND SISTEMELE DE TESTARE AEROBE ȘI ANAEROBE****Sistemul aerob de testare**

Sistemul aerob de testare descris în prezenta metodă de testare este format dintr-un strat aerob de apă (concentrațiile tipice ale oxigenului variază între 7 și 10 mg·l<sup>-1</sup>) și dintr-un strat de sediment aerob la suprafață și anaerob sub suprafață [potențialul redox mediu tipic ( $E_h$ ) din zona anaerobă a sedimentului variază între - 80 și - 90 mV]. În fiecare unitate de incubare se trece aer umed pe suprafața apei pentru a asigura o cantitate suficientă de oxigen în spațiul liber.

**Sistemul anaerob de testare**

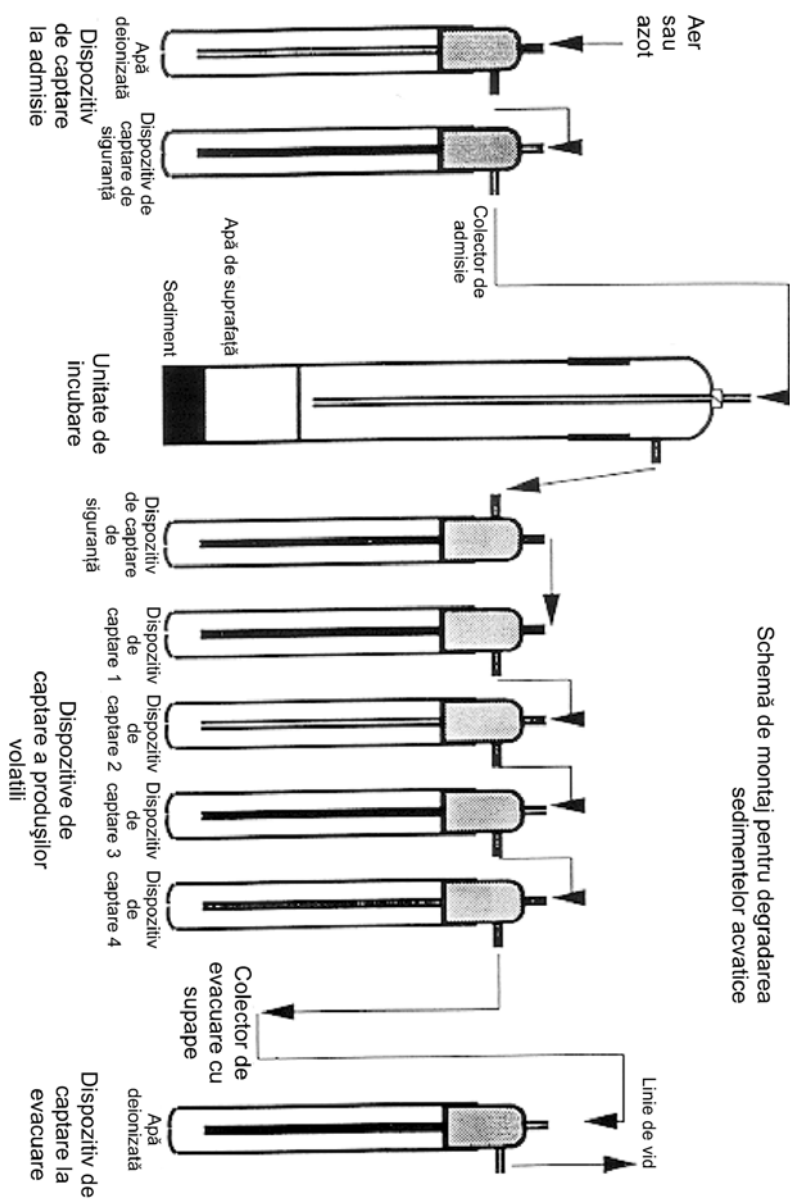
Metoda de test din cadrul sistemului anaerob de testare este practic aceeași cu cea din cadrul sistemului aerob, cu excepția faptului că se trece azot umed pe suprafața apei din fiecare unitate de incubare pentru a crea un spațiu liber cu azot. Sedimentele și apa se consideră anaerobe dacă potențialul redox ( $E_h$ ) este sub - 100 mV.

În cadrul testului anaerob, evaluarea mineralizării cuprinde măsurarea dioxidului de carbon și a metanului degajat.

▼B

## Apendicele 2

## EXEMPLU DE APARAT CU CIRCULAȚIE CONTINUĂ



Dispozitiv de captare de siguranță, gol

Dispozitivul de captare 1:

etilenglicol pentru captarea compușilor organici volatili

Dispozitivul de captare 2:

acid sulfuric 0,1M pentru captarea compușilor alcalini volatili

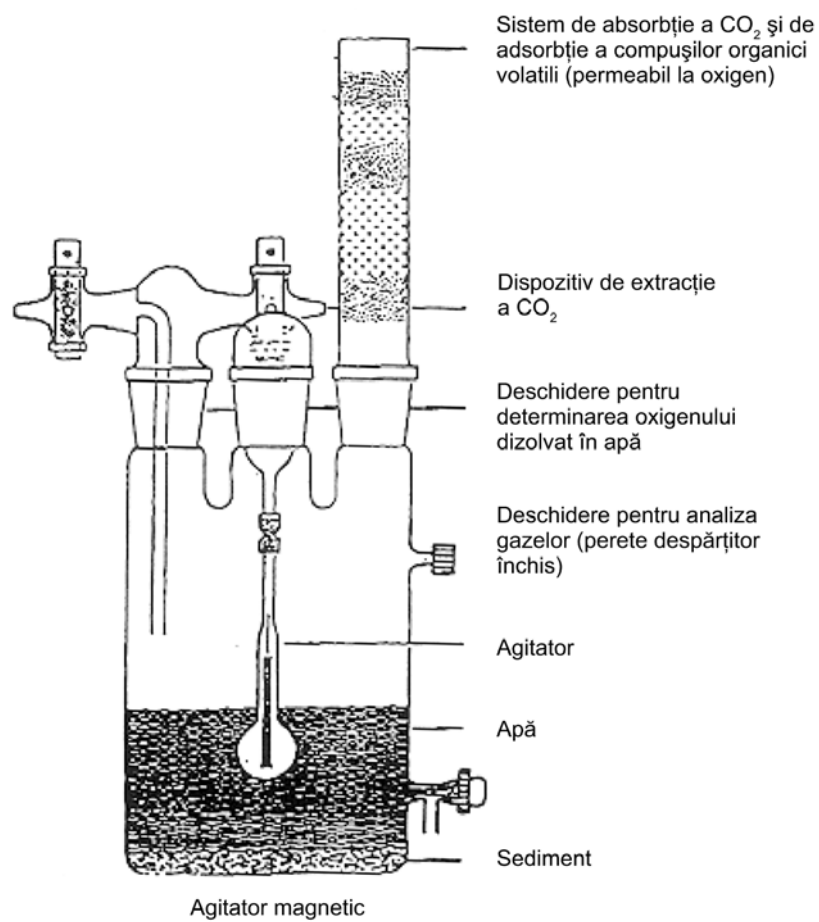
Dispozitivele de captare 3 și 4:

hidroxid de sodiu 2M pentru captarea  $\text{CO}_2$  și a altor compuși volatili acizi

▼ B

## Apendicele 3

## EXEMPLU DE BIOMETRU



**▼B***Apendicele 4***EXEMPLU DE CALCULARE A DOZEI APLICATE RECIPIENTULUI DE TESTARE**

Diametrul intern al cilindrului: = 8 cm

Adâncimea coloanei de apă, fără sediment: = 12 cm

Suprafață:  $3,142 \times 4^2$  = 50,3 cm<sup>2</sup>

Rata de aplicare: 500 g substanță de testat/ha  
înseamnă 5 μg/cm<sup>2</sup>

Total în μg:  $5 \times 50,3$  = 251,5 μg

Ajustarea cantității pentru o adâncime de 100 cm: = 30,18 μg

$12 \times 251,5 \div 100$

Volumul coloanei de apă:  $50,3 \times 12$  = 603 ml

Concentrația în apă:  $30,18 \div 603$  = 0,050 μg/ml sau μg/l

▼ **M1****C.25. MINERALIZAREA AEROBĂ ÎN APA DE SUPRAFAȚĂ – TEST DE SIMULARE A BIODEGRADĂRII****1. METODĂ**

Această metodă este echivalentă cu orientările OECD privind testele nr. 309 (2004)(1)

**1.1. INTRODUCERE**

Obiectivul acestui test vizează măsurarea în timp a biodegradării unei substanțe de testat la concentrație scăzută în apă aerobă în mod natural și cuantificarea observațiilor sub formă de expresii cinetice. Acest test de simulare este un test de laborator în serie prin metoda agitării flaconului pentru determinarea vitezelor de biodegradare aerobă a substanțelor organice în eșantioane de apă naturală de suprafață (dulce, salmastră sau marină). Se bazează pe ISO/DIS 14592-1 (2) și include, de asemenea, elemente ale metodelor de testare C.23 și C.24 (3)(4). Opțional, dacă perioada de testare este lungă, testarea în loturi se înlocuiește cu testarea semicontinuă, în scopul prevenirii deteriorării mediului de testare. Principalul obiectiv al testului de simulare constă în determinarea mineralizării substanței testate în apă de suprafață, iar mineralizarea constituie baza de exprimare a cineticii degradării. Un obiectiv opțional secundar al testului vizează obținerea de informații privind degradarea primară și formarea produșilor principali de transformare. Identificarea produșilor de transformare și, dacă este posibil, cuantificarea concentrațiilor acestora sunt importante în special pentru substanțe care se mineralizează foarte lent (de exemplu, cu perioade de înjumătățire pentru  $^{14}\text{C}$  rezidual total care depășesc 60 de zile). Ca urmare a limitărilor analitice, pentru identificarea și cuantificarea produșilor principali de transformare se folosesc, în mod normal, concentrații mai mari de substanță de testat ( $> 100 \mu\text{g/l}$ ).

O concentrație scăzută în acest test se referă la o concentrație (de exemplu mai mică de  $1 \mu\text{g/l}$  la  $100 \mu\text{g/l}$ ) suficient de scăzută pentru ca cinetica biodegradării rezultate în urma testului să o reflecte pe cea prevăzută pentru mediul ambiant. Comparativ cu masa totală a substraturilor de carbon biodegradabil disponibile în apa naturală folosită pentru testare, substanța testată prezintă în concentrație scăzută va avea rolul de substrat secundar. Aceasta presupune că cinetica anticipată a biodegradării este de prim ordin (cinetică de „non-creștere”), iar substanța testată poate fi degradată prin „cometabolism”. Cinetica de prim ordin presupune că viteza de degradare ( $\text{mg/l/zi}$ ) este proporțională cu concentrația substratului care descrește în timp. În cazul cineticii de prim ordin reale, constanta vitezei specifice de degradare  $k$  este independentă de timp și concentrație. Prin urmare,  $k$  nu variază apreciabil în cursul experimentului și nu se modifică în funcție de concentrația adăugată între experimente. Prin definiție, constanta vitezei specifice de degradare este egală cu modificarea relativă a concentrației în funcție de timp  $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$ . Deși, în condițiile descrise, se prevede obținerea unei cinetici de prim ordin, se pot manifesta circumstanțe în care este adecvată o cinetică de un tip diferit. Dacă viteza de biotransformare este limitată ca urmare a unor fenomene de transfer de masă, cum ar fi viteza de difuzie, în locul vitezei reacției biologice, pot fi observate abateri de la cinetica de prim ordin. Cu toate acestea, datele pot fi aproape întotdeauna descrise prin cinetică de pseudo-prim ordin, care acceptă o constantă a vitezei dependentă de concentrație.

▼ **M1**

În scopul facilitării stabilirii planului experimental și interpretării rezultatelor, informațiile despre biodegradabilitatea la concentrații mari a substanței testate (obținute în urma testelor standard de triere), precum și cele privind abiotică, producții de transformare și proprietățile fizico-chimice relevante trebuie să se cunoască înainte de test. Biodegradabilitatea finală poate fi stabilită ca urmare a folosirii substanțelor de testat marcate cu izotop  $^{14}\text{C}$  și determinarea distribuției fazice a  $^{14}\text{C}$  la sfârșitul testului. Dacă se folosește substanță de testat nemarcată, biodegradarea finală poate fi estimată doar dacă se testează o concentrație mai mare și se cunosc toți producții principali de transformare.

## 1.2. DEFINIȚII

**Biodegradare primară:** Modificarea (transformarea) structurii unei substanțe chimice sub acțiunea unor microorganisme, având ca rezultat pierderea proprietăților chimice.

**Biodegradare funcțională:** Modificarea (transformarea) structurii unei substanțe chimice ca urmare a acțiunii unor microorganisme, având ca rezultat pierderea unei anumite proprietăți chimice.

**Biodegradare aerobă finală:** Descompunerea unei substanțe chimice în dioxid de carbon, apă și săruri minerale ale oricărui alt element prezent sub acțiunea unor microorganisme în prezența oxigenului (mineralizare) și obținerea de biomasă și produși noi de biosinteză microbiană organică.

**Mineralizare:** Descompunerea unei substanțe chimice sau materii organice în dioxid de carbon, apă și săruri minerale ale oricărui alt element prezent ca urmare a acțiunii unor microorganisme în prezența oxigenului.

**Fază de latență:** Perioada cuprinsă între începutul unui test și momentul în care se realizează adaptarea microorganismelor care produc degradarea, iar gradul de biodegradare al unei substanțe chimice sau materii organice a crescut la un nivel detectabil (de exemplu 10 % din biodegradarea teoretică maximă sau mai puțin, în funcție de precizia metodei de măsurare).

**Nivel maxim de biodegradare:** Gradul de biodegradare a unei substanțe chimice sau materii organice într-un test, înregistrat în procente, dincolo de care nu are loc biodegradare în timpul testului.

**Substrat primar:** Colecție de surse naturale de energie și carbon care asigură creșterea și menținerea biomasei microbiene.

**Substrat secundar:** Componenta unui substrat prezentă într-o concentrație atât de scăzută, încât, în urma degradării sale, microorganismele competente primesc doar cantități minime de carbon și energie comparativ cu carbonul și energia furnizate prin degradarea componentelor substratului principal (substraturi primare).

**Constanta vitezei degradării:** Constantă cinetică de prim ordin sau pseudo-prim ordin  $k$  ( $\text{zi}^{-1}$ ), indicând viteza procesului de degradare. Pentru un experiment în serie,  $k$  se estimează din partea inițială a curbei degradării obținute după încheierea fazei de latență.

▼ **M1**

**Timp de înjumătățire,  $t_{1/2}$  (zi):** Termen folosit pentru caracterizarea vitezei unei reacții de prim ordin. Este intervalul de timp care corespunde unei scăderi a concentrației de 2 ori. Timpul de înjumătățire și constanta vitezei de degradare sunt corelate de ecuația  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

**Timp de înjumătățire a degradării,  $DT_{50}$  (zi):** Termen utilizat pentru cuantificarea rezultatului testelor de biodegradare. Este intervalul de timp (inclusiv faza de latență) necesar pentru atingerea unei valori de 50 % a biodegradării.

**Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ):** Limita de detecție (LOD) este concentrația unei substanțe sub nivelul căreia identitatea unei substanțe nu mai poate fi deosebită de artefactele analitice. Limita de cuantificare (LOQ) este concentrația unei substanțe sub nivelul căreia concentrația nu poate fi determinată cu o precizie acceptabilă.

**Carbon organic dizolvat (COD):** Acea parte a carbonului organic dintr-un eșantion de apă care nu poate fi eliminată prin separarea fazelor specificate, cum ar fi centrifugarea la  $40\,000\text{ ms}^{-2}$  timp de 15 minute sau filtrarea prin membrană cu pori de diametru  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ - $0,45\text{ }\mu\text{m}$ .

**Activitatea organică totală a  $^{14}\text{C}$  (TOA):** Activitatea totală a  $^{14}\text{C}$  asociată cu carbonul organic.

**Activitatea  $^{14}\text{C}$  organic dizolvat (DOA):** Activitatea totală a  $^{14}\text{C}$  asociată cu carbonul organic dizolvat.

**Activitatea  $^{14}\text{C}$  organic sub formă de particule (POA):** Activitatea totală a  $^{14}\text{C}$  asociată cu carbonul organic sub formă de particule.

### 1.3. APLICABILITATEA TESTULUI

Acest test de simulare este aplicabil substanțelor organice nevolatile sau ușor volatile testate la concentrații scăzute. Folosind recipiente în care intră aerul (de exemplu acoperite cu vată hidrofilă), substanțele cu o constantă a legii lui Henry mai mică de aproximativ  $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$  (aprox.  $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ) pot fi considerate practic nevolatile. Testarea substanțelor puțin volatile (cu constante ale legii lui Henry  $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$  sau  $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ) poate avea loc fără pierderi din sistemul de testare dacă se folosesc recipiente închise cu volum tampon.  $\text{CO}_2$  se va îndepărta cu respectarea măsurilor de siguranță adecvate, în caz contrar putând avea loc pierderi de substanță marcată cu  $^{14}\text{C}$ . În astfel de situații, poate fi necesară capturarea  $\text{CO}_2$  într-o coloană de absorbție conținând compuși alcalini sau folosirea unui sistem absorbant extern de  $\text{CO}_2$  (determinare directă a  $^{14}\text{CO}_2$ ; a se vedea apendicele 3). Pentru determinarea cineticii biodegradării, concentrațiile de substanță de testat trebuie să fie inferioare solubilității acesteia în apă. Trebuie remarcat totuși că valorile solubilității în apă din lucrările științifice pot fi considerabil mai mari decât solubilitatea substanței testate în ape naturale. Opțional, solubilitatea substanțelor de testat cu grad scăzut de solubilitate în apă poate fi stabilită prin folosirea apelor naturale testate.

Metoda poate fi folosită pentru simularea biodegradării în apă de suprafață care nu conține particule mari (test pelagic) sau în apă de suprafață cu turbiditate, de exemplu care poate exista în apropierea unei interfețe apă/sedimente (test pe sedimente în suspensie).



▼ **M1**

## 1.4. PRINCIPIUL TESTULUI

Testul se efectuează în serii, prin incubarea substanței de testat exclusiv cu apă de suprafață (test pelagic) sau apă de suprafață combinată cu solide/sedimente în suspensie între 0,01-1 g/l greutate uscată (test pe sedimente suspendate) pentru simularea unui curs de apă cu solide în suspensie sau sedimente resuspendate. Concentrația solidelor/sedimentelor suspendate în intervalul inferior al acestui domeniu este reprezentativă pentru majoritatea apelor de suprafață. Recipientele de testare sunt incubate la întuneric, la temperatura mediului ambiant, în condiții aerobe, și sunt agitate. Pentru determinarea cineticii degradării se vor folosi cel puțin două concentrații diferite ale substanței testate. Concentrațiile trebuie să difere între ele cu un factor cuprins între 5-10, care trebuie să reprezinte intervalul așteptat de concentrații în mediul ambiant. Concentrația maximă a substanței testate nu trebuie să depășească 100 µg/l, dar sunt preferate concentrațiile de testare maxime inferioare 10 µg/l pentru ca biodegradarea să fie conformă cineticii de prim ordin. Concentrația minimă nu trebuie să depășească 10 µg/l, dar sunt preferate concentrațiile minime de 1-2 µg/l sau inferioare 1 µg/l. În mod normal, o analiză adecvată a unor concentrații atât de scăzute se poate realiza cu ajutorul substanțelor marcate  $^{14}\text{C}$  disponibile în comerț. Ca urmare a limitărilor analitice, măsurarea concentrației substanței testate cu precizia necesară este de cele mai multe ori imposibilă dacă substanța testată se aplică la o concentrație  $\leq 100$  µg/l (a se vedea punctul 1.7.2 al doilea paragraf). Concentrațiile mai mari ale substanței testate ( $> 100$  µg/l și, uneori,  $> 1$  mg/l) pot fi folosite pentru identificarea și cuantificarea produșilor principali de transformare sau dacă nu există o metodă specifică de analiză cu o limită scăzută a detectării. Dacă se testează concentrații mari ale substanței testate, este posibil ca rezultatele să nu poată fi folosite pentru estimarea constantei degradării de prim ordin și a timpului de înjumătățire, deoarece degradarea ar putea să nu respecte cinetica de prim ordin.

Degradarea se urmărește la intervale de timp regulate prin măsurarea  $^{14}\text{C}$  rezidual sau, dacă se folosește o analiză chimică specifică, prin măsurarea concentrației substanței testate. Marcarea cu  $^{14}\text{C}$  a celei mai stabile părți a moleculei permite determinarea mineralizării totale, în timp ce marcarea cu  $^{14}\text{C}$  a părții mai puțin stabile a moleculei, precum și folosirea analizei specifice permit doar evaluarea biodegradării primare. Cu toate acestea, porțiunea cea mai stabilă nu include în mod obligatoriu fracțiunea funcțională relevantă a moleculei (care poate fi corelată cu o proprietate specifică, cum ar fi toxicitatea, bioacumularea etc.). În acest caz, se recomandă folosirea în porțiunea funcțională a unei substanțe de testat marcate cu  $^{14}\text{C}$  în scopul urmăririi eliminării acelei proprietăți.

## 1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

În acest test pot fi folosite deopotrivă substanțe de testat marcate sau nemarcate radioactiv. Se recomandă tehnica de marcarea cu  $^{14}\text{C}$ , iar marcarea trebuie să aibă loc în porțiunea (porțiunile) cea (cele) mai stabilă (stabile) a (ale) moleculei (a se vedea și punctul 1.4). În cazul substanțelor care conțin mai mult de un inel aromatic, se preferă ca unul sau mai mulți atomi de carbon din fiecare inel să se marcheze cu  $^{14}\text{C}$ . În plus, se preferă ca unul sau mai mulți atomi de carbon de pe ambele părți ale legăturilor ușor de scindat să se marcheze cu  $^{14}\text{C}$ . Puritatea chimică și/sau radiochimică a substanței testate trebuie să fie  $> 95\%$ . În cazul substanțelor marcate radioactiv este preferată o activitate specifică de aproximativ 50 µCi/mg (1,85 MBq) sau mai mare, în scopul facilitării măsurării  $^{14}\text{C}$  în testele realizate la concentrații inițiale scăzute. Vor fi disponibile următoarele informații despre substanța testată:

**▼ M1**

- solubilitatea în apă [metoda de testare A.6];
- solubilitatea în solvent (solvenți) organic (organici) (substanțe folosite împreună cu solvent sau cu solubilitate scăzută în apă);
- constanta de disociere (pKa) dacă este posibil ca substanța să fie supusă unei protonări sau deprotonări [orientarea nr. 112 a OECD] (5);
- presiunea de vapori (metoda A.4) și constanta legii lui Henry;
- stabilitate chimică în apă și la întuneric (hidroliză) [metoda C.7].

Când substanțele cu solubilitate scăzută în apă se testează în apă de mare, este utilă cunoașterea constantei de desalifiere (sau „constanta Setschenow”)  $K^s$ , definită prin expresia  $\log (S/S') = K^s C_m$ , unde S și S' sunt solubilitatea substanței în apă dulce și, respectiv, în apă de mare, iar  $C_m$  este concentrația molară de sare.

Dacă testul se desfășoară ca „test pe sedimente în suspensie”, următoarele informații vor fi disponibile:

- coeficientul de partiție n-octanol/apă [metoda A.8];
- coeficientul de adsorbție [metoda C.18].

Alte informații utile pot include:

- concentrația în mediu, dacă se cunoaște sau estimată;
- toxicitatea substanței testate asupra microorganismelor [metoda C.11];
- biodegradabilitatea imediată și/sau intrinsecă [metodele C.4 A-F, C.12, C.9, orientarea nr. 302 a OECD (5)];
- biodegradabilitatea aerobă sau anaerobă în sol și studii de transformare în sedimente/apă [metodele C.23, C.24].

## 1.6. SUBSTANȚĂ DE REFERINȚĂ

Se folosește ca substanță de referință o substanță în mod normal ușor degradabilă în condiții aerobe (de exemplu anilină sau benzoat de sodiu). Intervalul de timp preconizat pentru degradarea anilinei și benzoatului de sodiu este de obicei mai mic de două săptămâni. Scopul substanțelor de referință este de a asigura menținerea activității microbiene a apei de testare în anumite limite; de exemplu, se verifică dacă apa conține o populație microbiană activă.

▼ **M1****1.7. CRITERII DE CALITATE****1.7.1. Recuperare**

Imediat după adăugarea substanței de testat, fiecare concentrație inițială de testare se verifică prin măsurarea activității  $^{14}\text{C}$  sau prin analize chimice în cazul substanțelor nemarcate, în cel puțin eşantioane duble. Aceasta oferă informații privind aplicabilitatea și repetabilitatea metodei analitice, precum și omogenitatea distribuției substanței testate. În mod normal, activitatea  $^{14}\text{C}$  sau concentrația substanței testate măsurate inițial se folosesc în analizele ulterioare ale datelor, nu în concentrația nominală, deoarece pierderile provocate de sorbție și erorile de dozare sunt astfel compensate. În cazul substanței testate marcate cu  $^{14}\text{C}$ , nivelul de recuperare de la sfârșitul experimentului este dat de bilanțul maselor (a se vedea punctul 1.8.9.4 ultimul paragraf). În mod ideal, bilanțul maselor marcate radioactiv trebuie să fie cuprins între 90 % și 110 %, în timp ce precizia analitică trebuie să conducă la o recuperare inițială cuprinsă între 70 % și 110 % pentru substanțe de testat nemarcate. Aceste intervale se interpretează ca ținte și nu se folosesc sub formă de criterii pentru acceptabilitatea testului. Opțional, precizia analitică se poate determina pentru substanța testată la o concentrație mai mică decât cea inițială și pentru produșii de transformare.

**1.7.2. Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea de cinci analize duplicate ale extraselor individuale de apă de suprafață.

Limita de detecție (LOD) a metodei analitice pentru substanța de testat și produșii de transformare trebuie să fie, dacă este posibil, de cel puțin 1 % din cantitatea inițială folosită în sistemul de testare. Limita de cuantificare (LOQ) trebuie să fie egală sau mai mică de 10 % din concentrația aplicată. Analizele chimice ale multor substanțe organice și produșii lor de transformare impun frecvent ca substanța de testat să fie folosită la o concentrație relativ mare, de exemplu > 100 µg/l.

**1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****1.8.1. Aparatură**

Testul poate fi efectuat în recipiente conice sau cilindrice de capacitate corespunzătoare (de exemplu de 0,5 sau 1,0 l) acoperite cu dopuri de silicon sau cauciuc, sau în recipiente serologice închise ermetic (de exemplu cu membrană de cauciuc butilic). O altă opțiune de efectuare a testului constă în folosirea de recipiente multiple și recoltarea în întregime a conținutului acestora, cel puțin în duplicat, la fiecare interval de prelevare (a se vedea punctul 1.8.9.1 ultimul paragraf). În cazul substanțelor de testat nevolatile care nu sunt marcate radioactiv, dopurile sau capacele etanșe nu sunt necesare; sunt suficiente dopurile de vată care previn contaminarea din aer (a se vedea punctul 1.8.9.1 al doilea paragraf). Substanțele puțin volatile se testează într-un sistem de tip biometru, cu agitarea ușoară a suprafeței apei. În scopul prevenirii contaminării bacteriene, vasele pot fi sterilizate opțional prin încălzire sau autoclavare înainte de folosire. În plus, se folosesc următoarele echipamente standard de laborator:

— masă de agitare sau agitatoare magnetice pentru agitare continuă a recipientelor de testare;

▼ **M1**

- centrifugă;
- pH-metru;
- turbidimetru pentru măsurarea turbidității nefelometrice;
- etuvă sau cuptor cu microunde pentru determinarea greutateii uscate;
- dispozitiv de filtrare cu membrană;
- autoclavă sau etuvă pentru sterilizarea la căldură a vaselor din sticlă;
- instrumente de manipulare a substanțelor marcate cu  $^{14}\text{C}$ ;
- echipamente pentru cuantificarea activității  $^{14}\text{C}$  în eșantioane de soluții de captare a  $\text{CO}_2$  și, dacă este necesar, din eșantioane de sedimente;
- echipamente analitice pentru determinarea substanței testate (și de referință) dacă se folosește analiză chimică specifică (de exemplu cromatograf cu gaz, cromatograf cu lichid la înaltă presiune).

**1.8.2. Soluțiile mamă ale substanței testate**

Pentru pregătirea soluțiilor mamă ale substanțelor de testat și de referință se folosește apă deionizată (a se vedea punctul 1.8.7 primul paragraf). Apa deionizată nu trebuie să conțină substanțe toxice pentru microorganisme, iar carbonul organic dizolvat (COD) nu trebuie să depășească 1 mg/l (6).

**1.8.3. Colectarea și transportul apei de suprafață**

Locurile de prelevare pentru colectarea apei naturale se selectează în funcție de finalitatea testului în fiecare caz în parte. Pentru alegerea locurilor de prelevare trebuie avut în vedere istoricul eventualelor aporturi de natură agricolă, industrială sau menajeră. Dacă se cunoaște că un mediu acvatic a fost contaminat cu substanță de testat sau cu produși de natură analogă pe parcursul ultimilor 4 ani, acesta nu va fi folosit pentru prelevarea de apă, cu excepția cazului în care obiectivul expres al experimentatorului este cercetarea ratelor de degradare ale locurilor expuse anterior. pH-ul și temperatura apei se măsoară la locul de prelevare. În plus, adâncimea de prelevare și aspectul eșantionului de apă (de exemplu culoare și turbiditate) se înregistrează (a se vedea punctul 3). Concentrația de oxigen și/sau potențialul redox în apă și în stratul sedimentelor de suprafață se măsoară în scopul demonstrării condițiilor aerobe, cu excepția situației în care acestea sunt cunoscute ca urmare a observării aspectului și condițiilor anterioare de la locul de prelevare. Apa de suprafață se transportă într-un container care a fost curățat cu atenție. În timpul transportului, temperatura eșantionului nu trebuie să depășească semnificativ temperatura testului. Dacă durata transportului depășește 2-3 ore, se recomandă răcirea la 4 °C. Eșantionul de apă nu se congelează.

▼ **M1****1.8.4. Stocarea și prepararea apei de suprafață**

Se preferă ca textul să înceapă în termen de o zi de la colectarea eșantionului. Perioada de stocare a apei, dacă este necesară, se reduce la minimum și nu trebuie să depășească în niciun caz mai mult de 4 săptămâni. Eșantionul de apă se păstrează la 4 °C, în condiții de ventilație, până la folosire. Înainte de folosire, particulele mari se elimină, de exemplu prin filtrare cu ajutorul unui filtru de nailon cu o dimensiune a porilor de aproximativ 100 μm sau cu un filtru de hârtie cu porozitate mare sau prin sedimentare.

**1.8.5. Prepararea apei tratate cu sedimente (opțional)**

Pentru testul cu sedimente în suspensie, se adaugă sedimente de suprafață în recipiente conținând apă naturală (filtrată pentru eliminarea particulelor mari, conform descrierii de la punctul 1.8.4) pentru obținerea unei suspensii; concentrația solidelor în suspensie trebuie să fie între 0,01 și 1 g/l. Sedimentele de suprafață trebuie să provină din același loc de unde a fost prelevat eșantionul de apă. În funcție de mediul acvatic, sedimentele de suprafață pot fi caracterizate printr-un conținut ridicat de carbon organic (2,5-7,5 %) și o textură fină sau printr-un conținut scăzut de carbon organic (0,5-2,5 %) și o textură rugoasă (3). Sedimentele de suprafață se prepară după cum urmează: se extrag câteva carote de sediment intact folosind un tub de plastic transparent, se elimină straturile aerobe superioare (de la suprafață la o adâncime de max. 5 mm) imediat după prelevare și se combină. Eșantionul de sediment rezultat se transportă într-un recipient cu un volum mare al tamponului de aer pentru a menține sedimentul în condiții aerobe (răcit la 4 °C dacă durata transportului depășește 2-3 ore). Eșantionul de sediment se suspendă în apa de testare la un raport de 1:10 și se păstrează la 4 °C, în condiții de ventilație, până la folosire. Perioada de stocare a apei, dacă este necesară, se reduce la minimum și nu trebuie să depășească în niciun caz 4 săptămâni.

**1.8.6. Procedura semicontinuă (opțional)**

Dacă înainte ca substanța de testat să poată fi măsurată se manifestă o perioadă de latență lungă, poate fi necesară o incubare prelungită (câteva luni). Dacă acest aspect este cunoscut ca urmare a testării anterioare a unei substanțe, testul poate fi inițiat prin folosirea unei proceduri semicontinue, care permite reînnoirea periodică a unei porțiuni din apa sau suspensia de testare (a se vedea appendicele 2). Alternativ, dacă nu a avut loc o degradare a substanței de testat pe o perioadă de aproximativ 60 de zile de testare prin procedura în serii, testul normal în serii poate fi modificat într-un test semicontinuu (a se vedea punctul 1.8.8.3 al doilea paragraf).

**1.8.7. Adăugarea substanței de testat (sau de referință)**

Pentru substanțele cu solubilitate mare în apă ( $> 1 \text{ mg/l}$ ) și volatilitate scăzută (constante ale legii lui Henry  $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$  sau  $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ) se poate prepara o soluție mamă în apă deionizată (a se vedea punctul 1.8.2); în vasele de testare se adaugă volumul corespunzător de soluție mamă pentru obținerea concentrației dorite. Volumul oricărei soluții mamă adăugate se menține la minimul practic ( $< 10 \%$  din volumul lichid final, dacă este posibil). O altă procedură constă în dizolvarea substanței de testat într-un volum mai mare de apă de testat, aceasta putând fi considerată o alternativă la folosirea de solvenți organici.

▼ **M1**

Dacă nu se poate evita, soluțiile mamă ale substanțelor nevolatile cu solubilitate scăzută în apă se prepară prin folosirea unui solvent organic volatil, dar cantitatea de solvent adăugată în sistemul de testare nu trebuie să depășească 1 % v/v și nu trebuie să aibă efecte adverse asupra activității microbiene. Solventul nu trebuie să afecteze stabilitatea substanței testate în apă. Solventul se elimină până ajunge la o cantitate extrem de mică, astfel încât să nu contribuie la creșterea semnificativă a concentrației COD a apei sau a suspensiei de testat. Aceasta se verifică prin intermediul unei analize specifice substanței sau, dacă este posibil, prin analiză COD (6). Se vor lua măsuri pentru limitarea la strictul necesar a cantității de solvent transferate și pentru asigurarea dizolvării substanței testate în volumul final de apă de testat. Alte tehnici de introducere a substanței testate în vasele de testare sunt descrise la notele (7) și (8). Atunci când la aplicarea substanței de testat se folosește un solvent organic, probele martor ale solventului conținând apa de testat (fără adăugări) și apa de testat cu substanța de referință adăugată sunt tratate similar cu vasele de testare activă în care s-a adăugat substanța de testat în solvent purtător. Rolul probelor martor ale solventului este de a examina posibilele efecte adverse ale solventului asupra populației microbiene, acestea fiind indicate de degradarea substanței de referință.

1.8.8. **Condiții de testare**1.8.8.1. *Temperatura de testare*

Incubarea are loc la întuneric (preferabil) sau în condiții de lumină difuză, la temperatură controlată ( $\pm 2$  °C), care poate fi temperatura ambientală sau o temperatură standard cuprinsă între 20-25 °C. Temperatura ambientală poate fi temperatura reală a eșantionului în momentul prelevării sau o temperatură ambientală medie la locul de prelevare.

1.8.8.2. *Agitare*

Agitarea (scuturare sau agitare continuă) are rolul de a menține particulele și microorganismele în suspensie. Agitarea facilitează, de asemenea, transferul de oxigen din volumul tampon către lichid, în scopul menținerii condițiilor aerobe adecvate. Recipientele se așază pe o masă de agitare (cu o frecvență de aprox. 100 rpm) sau se folosește agitare magnetică. Agitarea trebuie să fie continuă. Cu toate acestea, scuturarea sau agitarea vor fi cât mai ușoare posibil, menținându-se în același timp o suspensie omogenă.

1.8.8.3. *Durata testului*

În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 60 de zile, cu excepția cazului în care se aplică procedura semicontinuă cu reînnoire periodică a suspensiei de testat (a se vedea punctul 1.8.6 și apendicele 2). Cu toate acestea, dacă substanța testată a început să se degradeze în primele 60 de zile, perioada de testare a seriei poate fi extinsă la cel mult 90 de zile. Degradarea se monitorizează prin determinarea activității  $^{14}\text{C}$  rezidual sau a  $^{14}\text{CO}_2$  degajat (a se vedea punctul 1.8.9.4) și/sau prin analiză chimică (punctul 1.8.9.5) la intervale de timp adecvate. Perioada de incubare trebuie să fie suficient de lungă pentru a permite evaluarea procesului de degradare. Preferabil, nivelul degradării trebuie să depășească 50 %; în cazul substanțelor lent degradabile, nivelul degradării trebuie să fie suficient (în mod normal, mai mare de 20 %) pentru a permite estimarea constantei vitezei cinetice de degradare.

▼ **M1**

Se vor efectua măsurători periodice ale pH-ului și concentrației oxigenului în sistemul de testare, cu excepția cazurilor în care astfel de teste sunt inutile ca urmare a existenței unor date anterioare din teste similare cu eșantioane de apă și sedimente colectate din același loc. În unele condiții, metabolismul substraturilor primare la concentrații mult mai mari în apă sau sedimente poate provoca o degajare de CO<sub>2</sub> și o epuizare a oxigenului suficient de mari pentru a modifica în mod semnificativ condițiile experimentale din timpul testului.

1.8.9. **Procedură**1.8.9.1. *Pregătirea recipientelor pentru testul pelagic*

Se transferă un volum corespunzător de apă de testat în recipientele de testare, până la aproximativ o treime din volumul recipientului, nu mai puțin de 100 ml. Dacă se folosesc recipiente multiple (care permit recoltarea conținutului din întregul recipient la fiecare punct de prelevare), volumul corespunzător al apei de testat va fi tot de 100 ml, deoarece volumele mici ale eșantioanelor pot influența lungimea fazei de latență. Substanța de testat se adaugă dintr-o soluție mamă conform descrierii de la punctele 1.8.2 și 1.8.7. Pentru determinarea cineticii degradării și calcularea constantei vitezei cineticii de degradare se vor folosi cel puțin două concentrații de substanță de testat, diferența dintre acestea fiind un factor cuprins între 5 și 10. Ambele concentrații selectate trebuie să fie mai mici de 100 µg/l și, preferabil, să se situeze în intervalul < 1-10 µg/l.

Recipientele se astupă cu dopuri sau capace impermeabile la aer și CO<sub>2</sub>. În cazul substanțelor chimice de testat nevolatile care nu sunt marcate cu <sup>14</sup>C, sunt suficiente dopurile de vată care previn contaminarea din aer (a se vedea punctul 1.8.1), dacă producții majore de degradare sunt cunoscute ca nevolatili și se folosește determinarea indirectă a CO<sub>2</sub> (a se vedea appendicele 3).

Recipientele se incubează la temperatura selectată (a se vedea punctul 1.8.8.1). Eșantioanele se retrag pentru analiză chimică sau măsurarea <sup>14</sup>C la începutul testului (înainte de începerea biodegradării; a se vedea punctul 1.7.1), apoi la intervale adecvate în cursul testului. Recoltarea se efectuează prin retragerea subeșantioanelor (de exemplu alicote de 5 ml) din fiecare duplicat sau prin recoltarea întregului conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare. Mineralizarea substanței de testat poate fi determinată în mod direct sau indirect (a se vedea appendicele 3). În mod obișnuit, în timpul fazei de degradare (după terminarea fazei de latență) sunt necesare minimum cinci puncte de prelevare pentru estimarea unei constante precise a vitezei, cu excepția cazurilor când se poate demonstra că trei puncte de prelevare sunt suficiente pentru substanțele cu degradare rapidă. Pentru substanțele care nu se degradează rapid se pot face mai multe măsurători în timpul fazei de degradare și, prin urmare, se vor folosi mai multe puncte experimentale pentru estimarea k. Deoarece viteza de biodegradare variază, nu poate fi indicat un program fix de recoltare; cu toate acestea, dacă degradarea este lentă, se recomandă ca recoltarea să aibă loc o dată pe săptămână. Dacă substanța testată este rapid degradabilă, recoltarea trebuie să se efectueze o dată pe zi în primele trei zile, apoi la fiecare două sau trei zile. În anumite situații, cum ar fi cele în care se lucrează cu substanțe rapid hidrolizabile, recoltarea poate fi necesară la intervale de o oră. Se recomandă efectuarea unui studiu preliminar înainte de test, în scopul stabilirii intervalelor de recoltare adecvate. Dacă eșantioanele trebuie să fie disponibile și pentru alte analize specifice, se recomandă recoltarea mai multor eșantioane și selectarea celor care urmează să fie analizate la sfârșitul experimentului prin intermediul unei strategii inverse, prin care ultimele eșantioane se analizează prima dată (a se vedea punctul 1.8.9.5 al doilea paragraf, pentru recomandări privind stabilitatea eșantioanelor în timpul stocării).

▼ **M1**1.8.9.2. *Numărul recipientelor și eșantioanelor*

Va fi disponibil un număr suficient de recipiente de testare pentru a avea:

- recipiente de testare: cel puțin două recipiente pentru fiecare concentrație a substanței de testat (preferabil, minimum 3) sau recipiente de testare multiple pentru fiecare concentrație, dacă se recoltează întregul conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare (reprezentate  $F_T$ );
- recipiente de testare pentru calculul bilanțului masic; cel puțin două recipiente pentru fiecare concentrație de testare (reprezentate  $F_M$ );
- probă martor, fără substanță de testat; cel puțin un recipient martor de testat conținând doar apa de testare (reprezentată  $F_B$ );
- etalon de referință; două recipiente cu substanță de referință (de exemplu anilină sau benzoat de sodiu, la 10  $\mu\text{g/l}$ ) (reprezentat  $F_C$ ). Scopul etalonului de referință este de a confirma un minim de activitate microbiană. Dacă este util, se poate folosi o substanță de referință marcată radioactiv, folosită și în cazurile când degradarea substanței de testat este monitorizată prin analize chimice;
- etalon steril; unul sau două recipiente conținând apă de testare sterilizată necesară pentru examinarea posibilei degradări abiotice sau pentru altă procedură de eliminare prin mijloace nebiologice a substanței de testat (reprezentat  $F_S$ ). Activitatea biologică poate fi oprită prin autoclavarea (121 °C; 20 min.) apei de testare sau prin adăugarea unei substanțe toxice [de exemplu azidă de sodiu ( $\text{NaN}_3$ ), clorură de mercur ( $\text{HgCl}_2$ ) la 100 mg/l sau formol la 100 mg/l] sau prin radiații gama. Dacă se folosește  $\text{HgCl}_2$ , acesta se va elimina conform procedurii pentru deșeuri toxice. Condițiile de sterilitate nu sunt ușor de obținut în cazul în care se adaugă apă cu sedimente în cantitate mare; în acest caz se recomandă autoclavarea repetată (de exemplu de trei ori). Trebuie avut în vedere că, prin autoclavare, caracteristicile de sorbție ale sedimentelor pot fi modificate;
- etaloane de solvent, conținând apă de testat și apă de testat cu substanță de referință; recipiente duble tratate cu aceeași cantitate de solvent și prin folosirea unei proceduri similare cu cea pentru aplicarea substanței de testat. Obiectivul este de a examina efectele adverse posibile ale solventului prin determinarea degradării substanței de referință.

În conceperea testului, experimentatorul trebuie să ia în considerare importanța relativă a creșterii duplicării experimentale comparativ cu creșterea numărului momentelor de recoltare. Numărul exact al recipientelor necesare va depinde de metoda folosită pentru măsurarea degradării (a se vedea punctul 1.8.9.1 al treilea paragraf, punctul 1.8.9.4 și apendicele 3).



▼ **M1**

În fiecare moment de prelevare, din fiecare recipient de testare se retrag două subeșantioane (de exemplu alicote de 5 ml). Dacă se folosesc mai multe recipiente pentru a fi posibilă recoltarea întregului conținut al recipientelor, în fiecare moment de prelevare se sacrifică cel puțin două recipiente (a se vedea punctul 1.8.9.1 primul paragraf).

#### 1.8.9.3. *Prepararea recipientelor pentru testul pe sedimente în suspensie [opțional]*

Se adaugă volumele necesare de apă și sedimente de testare în vasele de testare, dacă este necesar (a se vedea punctul 1.8.5). Procedura de pregătire a recipientelor pentru testul pe sedimente în suspensie este similară cu cea pentru testul pelagic (a se vedea punctele 1.8.9.1 și 1.8.9.2). Se folosesc, preferabil, flacoane serologice sau recipiente de o formă asemănătoare. Sticlele (închise) se așază orizontal pe un agitator. Recipientele deschise pentru substanțe nevolatile care nu sunt marcate cu  $^{14}\text{C}$  se așază, evident, în poziție verticală; în astfel de situații se recomandă folosirea unui agitator magnetic și a unor tije magnetice căptușite cu sticlă. Dacă este necesar, sticlele se aerisesc pentru menținerea condițiilor aerobe adecvate.

#### 1.8.9.4. *Determinări radiochimice*

$^{14}\text{CO}_2$  degajat se măsoară indirect sau direct (a se vedea apendicele 3).  $^{14}\text{CO}_2$  se determină indirect prin diferența între activitatea inițială a  $^{14}\text{C}$  în apa sau în suspensia de testat și activitatea reziduală totală în momentul prelevării, măsurată după acidifierea eșantionului la pH 2-3 și eliminarea  $\text{CO}_2$ . Astfel, carbonul anorganic este îndepărtat, iar activitatea reziduală măsurată provine din materialul organic. Determinarea indirectă a  $^{14}\text{CO}_2$  nu se folosește dacă în timpul transformării substanței testate se formează produși majori volatili de transformare (a se vedea apendicele 3). Dacă este posibil, degajarea  $^{14}\text{CO}_2$  se măsoară direct (a se vedea apendicele 3) în fiecare moment de prelevare în cel puțin un recipient de testare; această procedură permite verificarea deopotrivă a bilanțului masic și a procesului de biodegradare, dar este limitată la teste efectuate cu recipiente închise.

Dacă  $^{14}\text{CO}_2$  degajat se măsoară direct în timpul testului, la începutul acestuia vor fi pregătite mai multe recipiente în acest scop. Dacă în timpul transformării substanței de testat se formează produși majori volatili de transformare, se recomandă determinarea directă a  $^{14}\text{CO}_2$ . În fiecare punct de măsurare, recipientele de testare suplimentare se acidificază la pH 2-3, iar  $^{14}\text{CO}_2$  se colectează într-un absorbant intern sau extern (a se vedea apendicele 3).

Opțional, concentrațiile substanței de testat marcate cu  $^{14}\text{C}$  și ale produșilor majori de transformare se pot determina prin folosirea radiocromatografiei (cromatografie în strat subțire, RAD-TLC) sau HPLC cu detectare radiochimică.

Opțional, se poate determina distribuția fazică a radioactivității rămase (a se vedea apendicele 1), a substanței de testat reziduale și a produșilor de transformare.

▼ **M1**

La sfârșitul testului, bilanțul masic se determină prin măsurare directă a  $^{14}\text{CO}_2$  folosind recipiente de testare separate, din care nu se recoltează eșantioane în cursul testului (a se vedea appendicele 3).

1.8.9.5. *Analiză chimică specifică*

Dacă există o metodă analitică specifică sensibilă, biodegradarea primară se poate evalua prin măsurarea concentrației reziduale totale a substanței testate, și nu prin folosirea tehnicilor de marcare radioactivă. Dacă se folosește o substanță de testat marcată radioactiv (pentru măsurarea mineralizării totale), se pot realiza în paralel analize chimice specifice care să ofere informații suplimentare utile și să contribuie la verificarea procedurii. Analizele chimice specifice mai pot fi folosite pentru măsurarea produșilor de transformare formați în timpul degradării substanței de testare, acestea fiind recomandate pentru substanțe care se mineralizează cu timpi de înjumătățire care depășesc 60 de zile. La fiecare prelevare se măsoară și se înregistrează concentrația substanței de testat și produșii de transformare (ca procent și concentrație de substanță aplicată). Ca regulă generală, se identifică toți produșii de transformare pentru care se detectează  $\geq 10\%$  din concentrația aplicată, indiferent de momentul prelevării, cu excepția cazurilor în care există justificări rezonabile. Se identifică, de asemenea, produșii de transformare a căror concentrație crește constant pe durata studiului, chiar și în cazurile în care concentrațiile acestora nu depășesc limitele menționate mai sus, deoarece este posibil ca acesta să fie un indiciu asupra persistenței. Vor fi avute în vedere analize ale produșilor de transformare din etaloanele sterile dacă se consideră că sunt posibile transformări abiotice rapide ale substanței de testat (hidroliză). Nevoia de cuantificare și identificare a produșilor de transformare va fi examinată de la caz la caz, justificările fiind indicate în raport. Tehnicile de extracție cu solvent organic se aplică în conformitate cu îndrumările prezentate în procedura analitică respectivă.

Dacă analiza se desfășoară în 24 de ore (preferabil), toate eșantioanele se păstrează închise ermetic, la temperaturi între 2-4 °C. Pentru perioade mai lungi de stocare, eșantioanele se congelează sub  $-18\text{ °C}$  sau se conservă prin metode chimice. Nu se recomandă metoda de păstrare prin acidifiere, deoarece eșantioanele acidificate pot fi instabile. Dacă eșantioanele nu sunt analizate în termen de 24 de ore și se păstrează pentru o perioadă mai lungă, se va efectua un studiu privind stabilitatea la stocare, pentru a se determina dacă substanțele chimice de interes sunt stabile la temperaturi mai mici de  $-18\text{ °C}$  sau în stare de conservare. Dacă metoda analitică presupune extracția cu solvent sau în fază solidă (SPE), extracția se efectuează imediat după recoltare sau după stocarea eșantionului la rece timp de maximum 24 de ore.

În funcție de sensibilitatea metodei analitice, pot fi necesare volume mai mari ale eșantionului decât cele indicate la punctul 1.8.1. Testul poate fi desfășurat cu ușurință cu volume de testare de un litru în recipiente cu un volum de 2-3 litri, ceea ce face posibilă recoltarea de eșantioane de aprox. 100 ml.

▼ **M1****2. DATE ȘI RAPORT****2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR****2.1.1. Reprezentarea grafică a datelor**

Timpii de recoltare se rotunjesc la un număr întreg de ore (cu excepția cazului în care substanța se degradează substanțial într-o perioadă de minute sau ore), dar nu la un număr întreg de zile. Se reprezintă estimările activității reziduale ale substanței de testat (pentru substanțe marcate cu  $^{14}\text{C}$ ) sau concentrația reziduală (pentru substanțele nemarcate) în funcție de timp atât într-un grafic linear, cât și în unul semilogaritm (a se vedea figurile 1a, 1b). Dacă degradarea a avut loc, se compară rezultatele recipientelor  $F_T$  cu cele ale recipientelor  $F_S$ . Dacă mediile rezultatelor pentru recipientele cu substanță de testat ( $F_T$ ) și pentru recipientele sterile ( $F_S$ ) deviază cu mai puțin de 10 %, se presupune că degradarea observată este predominant abiotică. Dacă degradarea din recipientele ( $F_S$ ) este mai scăzută, cifrele pot fi folosite pentru a le corecta pe cele obținute cu recipientele  $F_T$  (prin scădere) în scopul estimării nivelului biodegradării. Când se efectuează analize opționale pentru produșii principali de transformare, formarea și declinul lor se reprezintă alături de graficul declinului substanței testate.

Durata  $t_L$  a fazei de latență se estimează din curba degradării (grafic semilogaritm) prin extrapolarea porțiunii sale lineare la degradare zero sau, alternativ, prin determinarea timpului pentru o degradare de aproximativ 10 % (figurile 1a și 1b). Constanta vitezei de prim ordin  $k$  se estimează pe baza graficului semilogaritm, iar eroarea sa standard se stabilește prin regresia lineară a  $\ln$  (activitatea reziduală a  $^{14}\text{C}$  sau concentrația substanței testate) în funcție de timp. În ceea ce privește măsurătorile  $^{14}\text{C}$ , în special, se folosesc doar date care aparțin porțiunii lineare inițiale a curbei după terminarea fazei de latență și se preferă selectarea de date mai puține, dar mai reprezentative, în locul selectării unui număr mare de date incerte. În acest caz, incertitudinea se referă la erori intrinseci legate de folosirea directă recomandată a activităților  $^{14}\text{C}$  rezidual măsurat (a se vedea mai jos). Dacă degradarea urmează un model bifazic, uneori poate fi utilă calcularea a două constante diferite ale vitezei. În acest scop, sunt definite două faze diferite ale curbei degradării. Calcularea constantei vitezei de degradare  $k$  și a timpului de înjumătățire  $t_{1/2} = \ln 2/k$  se realizează pentru fiecare dintre recipientele duplicate, dacă se extrag subeșantioane din același recipient, sau prin folosirea valorilor medii, când se recoltează întregul conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare (a se vedea punctul 1.8.9.2 ultimul paragraf). Când se folosește prima dintre procedurile menționate, constanta vitezei și timpul de înjumătățire se raportează pentru fiecare dintre recipientele duplicate ca valoare medie cu o eroare standard. Dacă au fost folosite concentrații mari ale substanțelor de testat, curba degradării poate devia considerabil de la o linie dreaptă (grafic semilogaritm), iar cinetica de prim ordin poate să nu fie validă. Prin urmare, definirea timpului de înjumătățire nu are sens. Cu toate acestea, timpul de înjumătățire a degradării  $DT_{50}$  (perioada necesară pentru atingerea unei degradări de 50 %) poate fi estimat ca urmare a aplicării cineticii de pseudo-prim ordin pentru un interval limitat de date. Trebuie reținut totuși că perioada degradării dincolo de intervalul selectat de date nu poate fi previzionată folosind  $DT_{50}$ , acesta fiind doar un indicator al unui set de date oferite. Oferta de instrumente analitice pentru facilitarea calculelor statistice și a interpolării este bogată, folosirea acestui tip de software fiind recomandată.

▼ **M1**

Dacă se realizează analize chimice specifice, constantele vitezei și timpii de înjumătățire pentru degradarea primară se estimează conform metodei de mai sus pentru mineralizarea totală. Dacă degradarea primară este procesul limitant, uneori pot fi folosite puncte experimentale din întregul proces de degradare. Aceasta se întâmplă deoarece, spre deosebire de măsurătorile activității  $^{14}\text{C}$ , măsurătorile sunt directe.

Dacă se folosesc substanțe marcate cu  $^{14}\text{C}$ , cel puțin la sfârșitul testului se va exprima un bilanț masic în procente din concentrația aplicată inițial.

2.1.2. **Activitate reziduală**

Când porțiunea marcată cu  $^{14}\text{C}$  a unei substanțe organice se biodegradează, porțiunea principală a  $^{14}\text{C}$  se transformă în  $^{14}\text{CO}_2$ , în timp ce o altă porțiune este folosită pentru creșterea biomasei și/sau sinteza metaboliților extracelulari. Prin urmare, biodegradabilitatea „finală” completă a unei substanțe nu are ca rezultat transformarea în proporție de 100 % a carbonului său în  $^{14}\text{CO}_2$ .  $^{14}\text{C}$  inclus în produse formate prin biosinteză este degajat lent ulterior ca  $^{14}\text{CO}_2$  ca urmare a „mineralizării secundare”. Din aceste cauze, graficele activității  $^{14}\text{C}$  organic rezidual (măsurat după îndepărtarea  $\text{CO}_2$ ) sau a  $^{14}\text{CO}_2$  produs în funcție de timp arată o „coadă” după ce degradarea s-a finalizat. Acest lucru complică interpretarea cinetică a datelor și, în acest scop, doar partea inițială a curbei (după terminarea fazei de latență și înainte de atingerea nivelului de 50 % degradare) se folosește în mod normal pentru estimarea unei constante a vitezei de degradare. Dacă substanța testată este degradată, activitatea  $^{14}\text{C}$  organic rezidual este întotdeauna mai mare decât activitatea  $^{14}\text{C}$  asociată cu substanța testată rămasă intactă. Dacă substanța testată se degradează ca urmare a unei reacții de prim ordin, iar o fracțiune constantă  $\alpha$  se mineralizează în  $\text{CO}_2$ , panta inițială a curbei de dispariție a  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$  total organic în funcție de timp) va fi  $\alpha$  înmulțit cu panta curbei corespunzătoare concentrației substanței testate (sau, pentru precizie, partea substanței testate marcate cu  $^{14}\text{C}$ ). Dacă se folosesc măsurătorile activității  $^{14}\text{C}$  organice totale necorectate, constanta calculată a vitezei degradării va fi conservativă. Proceduri de estimare a concentrațiilor substanței testate din activitățile radiochimice măsurate bazate pe diferite ipoteze de simplificare au fost descrise în literatura de specialitate (2)(9)(10)(11). Astfel de proceduri sunt cel mai ușor de aplicat pentru substanțele cu degradare rapidă.

2.2. **INTERPRETAREA REZULTATELOR**

Dacă se constată că valoarea  $k$  este independentă de concentrația adăugată (în cazul în care  $k$  obținut în urma calculelor este aproximativ egal la concentrații diferite ale substanței de testat), se presupune reprezentativitatea constantei vitezei de prim ordin pentru condițiile de testare folosite, cum ar fi substanța de testat, eșantionul de apă și temperatura de testare. Măsura în care rezultatele pot fi generalizate sau extrapolate către alte sisteme se evaluează de către experți. Dacă se folosește o concentrație mare a substanței de testat și, prin urmare, degradarea nu urmează cinetica de prim ordin, datele nu pot fi folosite pentru estimarea directă a unei constante a vitezei de prim ordin sau a timpului de înjumătățire corespunzător. Cu toate acestea, datele obținute în urma unui test folosind o concentrație mare a substanței de testat pot fi în continuare utile pentru estimarea gradului de mineralizare totală și/sau detectarea sau cuantificarea produșilor de transformare.

## ▼ M1

Dacă se cunosc vitezele unor procese de pierdere altele decât biodegradarea (de exemplu hidroliză sau volatilizare), acestea pot fi scăzute din viteză netă de pierdere observată în timpul testului, pentru a se obține o estimare aproximativă a vitezei de biodegradare. Datele pentru hidroliză pot fi obținute, printre altele, din etalonul steril sau în urma testării paralele cu o concentrație mai mare a substanței testate.

Determinarea directă și indirectă a  $^{14}\text{CO}_2$  (punctul 1.8.9.4 și apendicele 3) pot fi folosite doar pentru măsurarea gradului de mineralizare a substanței testate în  $\text{CO}_2$ . Analiza concentrației substanței de testat marcate cu  $^{14}\text{C}$  și a formării produșilor majori de transformare se poate realiza cu ajutorul metodelor radiocromatografiei (RAD-TLC) sau HPLC (punctul 1.8.9.4 al treilea paragraf). Pentru a se permite estimarea directă a timpului de înjumătățire, nu trebuie să fie prezenți produși majori de transformare (definiți ca  $\geq 10\%$  din cantitatea aplicată de substanță de testat). Dacă sunt prezenți produși majori de transformare care corespund definiției de mai sus, este necesară o evaluare detaliată a datelor. Aceasta poate include testarea și/sau identificarea repetată a produșilor de transformare (a se vedea punctul 1.8.9.5 primul paragraf), cu excepția situației în care evoluția produșilor de transformare poate fi evaluată cu un grad rezonabil de precizie pe baza experienței (de exemplu informații despre calea de degradare). Deoarece proporția carbonului din substanța de testat convertit în  $\text{CO}_2$  variază (depinzând în mare măsură de concentrația substanței de testat și a altor substraturi disponibile, condițiile de testare și populația microbiană), acest test nu permite o estimare clară a biodegradării finale, asemeni celei din testul de epuizare COD; totuși, rezultatele sunt similare cu cele obținute ca urmare a folosirii unui test respirometric. Astfel, gradul de mineralizare va fi mai mic sau egal cu nivelul minim al biodegradării finale. Pentru a se obține o imagine completă a biodegradării finale (mineralizarea și incorporarea în biomasă), la sfârșitul testului se efectuează analiza distribuției fazice a  $^{14}\text{C}$  (a se vedea apendicele 1).  $^{14}\text{C}$  din amestecul de particule va consta în  $^{14}\text{C}$  încorporat în biomasa bacteriană și  $^{14}\text{C}$  absorbit în particule organice.

### 2.3. VALIDITATEA TESTULUI

Dacă substanța de referință nu se degradează în intervalul de timp prevăzut (pentru anilină și benzoat de sodiu, în mod normal, mai puțin de două săptămâni), validitatea testului poate fi pusă sub semnul întrebării și trebuie verificată sau, alternativ, testul se repetă cu un nou eșantion de apă. Într-un test interlaboratoare ISO al metodei, la care au participat șapte laboratoare din Europa, constantele adaptate ale vitezei de degradare pentru anilină s-au situat în intervalul  $0,3\text{--}1,7\text{ zi}^{-1}$ , cu o medie de  $0,8\text{ zi}^{-1}$  la  $20\text{ }^\circ\text{C}$  și o eroare standard de  $\pm 0,4\text{ zi}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0,9$  zile). Timpii de latență tipici s-au situat între 1 și 7 zile. Pentru apele examinate a fost raportată o biomasă bacteriană corespunzând la  $10^3\text{--}10^4$  unități formatoare de colonii (UFC) per ml. Vitezele de degradare în apele central-europene bogate în nutrienți au fost mai mari decât în apele oligotrofe nordice, ceea ce se poate datora stării trofice diferite sau expunerii anterioare la substanțe chimice.

Recuperarea totală (bilanțul masic) la sfârșitul experimentului trebuie să fie cuprinsă între  $90\%$  și  $110\%$  pentru substanțele marcate radioactiv, în timp ce recuperarea inițială la începutul experimentului trebuie să fie cuprinsă între  $70\%$  și  $110\%$  pentru substanțele nemarcate. Cu toate acestea, intervalele indicate se interpretează doar ca ținte și nu se folosesc drept criterii de acceptare a testului.

**▼ M1**

3.

**RAPORT DE TESTARE**

Tipul studiului (test pelagic sau pe sedimente în suspensie) se indică clar în raportul de testare, care va mai conține cel puțin următoarele informații:

Substanță(e) de testat și de referință:

- denumirile uzuale, numele substanțelor chimice (se recomandă numele IUPAC și/sau CAS), numerele CAS, formulele structurale (indicând poziția  $^{14}\text{C}$  dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanței de testat și de referință (a se vedea punctele 1.5 și 1.6);
- numele substanțelor chimice, numerele CAS, formulele structurale (indicând poziția  $^{14}\text{C}$  dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanțelor folosite ca standarde de identificare sau cuantificare a produșilor de transformare;
- puritatea (impuritățile) substanțelor de testat și de referință;
- puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

Apa de suprafață:

Se furnizează cel puțin următoarele informații despre eșantionul de apă:

- locația și descrierea locului de recoltare, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminărilor;
  - data și locul colectării eșantionului;
  - nutrienți (N total, amoniu, azotit, azotat, P total, ortofosfat dizolvat);
  - adâncimea de colectare;
  - aspectul eșantionului (de exemplu culoare și turbiditate);
  - DOC și COT;
  - CBO;
  - temperatura și pH-ul la momentul colectării;
  - prezența oxigenului sau potențialul redox (obligatoriu doar dacă nu sunt evidente condiții aerobe);
  - salinitatea sau conductivitatea (în cazul apei de mare sau al apei salmastre);
  - solide în suspensie (în cazul unui eșantion tulbure);
  - posibil, alte informații relevante despre locația de recoltare în momentul colectării (de exemplu informații actuale sau istorice despre viteza de curgere a râurilor sau a curenților marine, deversările importante apropiate și tipul de deversare, condițiile meteorologice anterioare momentului recoltării);
- și opțional:
- biomasa microbiană (de exemplu aprecierea directă a oranjului de acridină sau a unităților formatoare de colonii);

**▼ M1**

- carbonul anorganic;
- concentrația de clorofilă-a ca indicator specific al biomasei algelor.

În plus, dacă se efectuează testul pe sedimente suspendate, se furnizează următoarele informații despre sedimente:

- adâncimea de colectare a sedimentelor;
- aspectul sedimentului (colorat, noroios, nămolos sau nisipos);
- textura (de exemplu procentul de nisip grunjos, nisip fin, nămol și argilă);
- greutatea uscată în g/l a solidelor în suspensie, concentrația COT sau pierderea de greutate la calcinare ca metodă de măsurare a conținutului materiei organice;
- pH;
- prezența oxigenului sau potențialul redox (obligatoriu doar dacă nu sunt evidente condiții aerobe).

Condițiile de testare:

- intervalul între colectare și folosire în testul de laborator, păstrarea eșantionului și pretratarea eșantionului, datele efectuării studiilor;
- cantitatea de substanță de testat aplicată, concentrația de testare și substanța de referință;
- metoda de aplicare a substanței de testat, inclusiv folosirea de solvenți;
- volumul de apă de suprafață și de sedimente folosite (dacă sunt folosite) și volumul recoltat pentru analiză la fiecare moment;
- descrierea sistemului de testare folosit.

Dacă nu se păstrează întunericul, informații despre condițiile de „iluminare difuză”;

- informații despre metoda (metodele) folosite pentru stabilirea etaloanelor sterile (de exemplu temperatură, perioadă și număr de autoclavări);
- temperatura de incubare;
- informații despre tehnicile analitice și metoda (metodele) folosite pentru măsurătorile radiochimice, precum și pentru verificarea bilanțului masic și măsurarea distribuției fazice (dacă este cazul);
- numărul de duplicate.

Rezultate:

- procente de recuperare (a se vedea punctul 1.7.1);
- repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice folosite, inclusiv limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ) (a se vedea punctul 1.7.2);

**▼ M1**

- toate datele măsurate (inclusiv punctele de recoltare) și valorile calculate în formă tabelară, precum și curbele de degradare; pentru fiecare concentrație de testare și pentru fiecare recipient duplicat se raportează coeficientul de corelație lineară pentru panta logaritmică, faza de latență estimată și o constantă a vitezei de prim ordin sau pseudo-prim ordin (dacă este posibil) și timpul de înjumătățire corespunzător al degradării (sau perioada de înjumătățire,  $t_{50}$ );
- valorile relevante se raportează ca medii ale rezultatelor observate la duplicatele individuale, cum ar fi durata fazei de latență, constanta vitezei degradării și timpul de înjumătățire a degradării (sau  $t_{50}$ );
- sistemul este clasificat ca neadaptat sau adaptat pe baza aspectului curbei de degradare și a posibilei influențe a concentrației de testare;
- rezultatele verificării bilanțului masic final și rezultatele măsurării distribuției fazice (dacă există);
- fracțiunea  $^{14}\text{C}$  mineralizat și, dacă se folosesc analize specifice, nivelul final de degradare primară;
- identificarea, concentrația molară și procentajul de produși aplicați și produși majori de transformare (a se vedea punctul 1.8.9.5 primul paragraf), dacă este cazul;
- propunerea unei căi de transformare, dacă este cazul;
- discutarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

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. Metoda de testare C.23. Transformarea aerobă și anaerobă în sol.
4. Metoda de testare C.24. Transformarea aerobă și anaerobă în sedimente acvatice.
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.



**▼ M1**

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  $^{14}\text{C}$ -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.

▼ **M1***Apendicele 1***Distribuția fazică a  $^{14}\text{C}$** 

În scopul verificării procedurii, măsurătorile de rutină ale activității  $^{14}\text{C}$  organice totale (TOA) reziduale se completează cu măsurările bilanțului masic care presupun o determinare directă a  $^{14}\text{CO}_2$  degajat după captarea într-un absorbant (a se vedea apendicele 3). Formarea de  $^{14}\text{CO}_2$  este, în sine, o probă directă a biodegradării în contrast cu degradarea abiotică sau alte mecanisme de pierdere, cum ar fi volatilizarea sau absorbția. Informații utile suplimentare ce caracterizează biodegradabilitatea pot fi obținute în urma măsurării distribuției TOA între starea dizolvată (activitatea  $^{14}\text{C}$  organic dizolvat, DOA) și starea sub formă de particule (activitatea  $^{14}\text{C}$  sub formă de particule, POA) după separarea particulelor prin filtrarea prin membrană sau centrifugare. POA constă în substanță de testat absorbită în biomasa microbiană și în alte particule pe lângă carbonul substanței de testat care a fost folosit pentru sinteza noului material celular și, prin urmare, încorporat în fracțiunea biomasei sub formă de particule. Formarea de material organic  $^{14}\text{C}$  dizolvat poate fi estimată ca DOA la sfârșitul biodegradării (platou al curbei degradării în funcție de timp).

Distribuția fazică a  $^{14}\text{C}$  rezidual din eșantioanele selectate se estimează prin filtrarea acestora printr-o membrană filtrantă de 0,22  $\mu\text{m}$  sau 0,45  $\mu\text{m}$  dintr-un material care nu adsoarbe cantități semnificative ale substanței de testat (de exemplu filtrele din policarbonat). Dacă cantitatea de substanță de testat absorbită în filtru este prea mare pentru a fi neglijată (a se verifica înainte de experiment), în locul filtrării poate fi folosită metoda centrifugării la viteză mare (2 000 g; 10 min).

Filtratul sau centrifugatul se tratează conform metodei pentru eșantioane nefiltrate din apendicele 3. Membranele filtrante se dizolvă în fluid de scintilație corespunzător și se face numărarea în mod obișnuit, atenuarea fiind corectată de obicei doar prin folosirea metodei raportului față de standardul extern sau prin oxidarea eșantionului. Dacă s-a folosit metoda centrifugării, granulele formate din fracțiunea sub formă de particule se suspendă din nou în 1-2 ml de apă distilată și se transferă într-un flacon de scintilație. Se spală ulterior de două ori cu câte 1 ml apă distilată, care se transferă apoi în flacon. Dacă este necesar, suspensia poate fi introdusă într-un gel pentru numărarea scintilației lichide.

▼ **M1***Apendicele 2***Procedura semicontinuă**

Pentru degradarea substanțelor rezistente poate fi necesară o incubare prelungită, de până la câteva luni. În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 60 de zile, cu excepția cazului când caracteristicile eșantionului original de apă se mențin prin reînnoirea suspensiei de testat. Cu toate acestea, dacă substanța testată a început să se degradeze în primele 60 de zile, perioada de testare poate fi extinsă la cel mult 90 de zile fără reînnoirea suspensiei de testat.

În timpul incubării pentru perioade lungi, diversitatea populației microbiene poate să fie redusă ca urmare a diverse mecanisme de pierdere și a posibilei epuizări a nutrienților necesari și a substraturilor primare de carbon din eșantionul de apă. Se recomandă, prin urmare, efectuarea unui test semicontinuu în scopul determinării corecte a vitezei de degradare a substanțelor lent degradabile. Testul se inițiază prin folosirea procedurii semicontinue dacă, pe baza experienței anterioare, se crede că va fi necesară o perioadă de incubare de trei luni pentru obținerea unui procent de degradare a substanței de 20 %. Alternativ, dacă nu a avut loc degradarea substanței testate în aproximativ 60 de zile de testare prin metoda în serii, acesta poate fi modificat într-un test semicontinuu. Dacă a fost înregistrată o degradare substanțială (de exemplu > 20 %), procedura semicontinuă poate fi întreruptă, iar testul continuat ca experiment în serii.

În testul semicontinuu, la fiecare două săptămâni, aproximativ 1/3 din volumul suspensiei de testat se înlocuiește cu apă proaspăt colectată, substanța testată adăugându-se la concentrația inițială. În mod similar, dacă s-a efectuat testul opțional pe sedimente în suspensie, sedimentul se adaugă la apa de înlocuire până la atingerea concentrației inițiale (între 0,01 și 1 g/l). În ceea ce privește desfășurarea testului cu solide de sediment în suspensie, este important ca sistemul să fie menținut în suspensie completă și în timpul reînnoirii apei, iar timpul de reținere să fie identic pentru solide și apă, în caz contrar putându-se pierde similaritatea dorită cu un sistem omogen apos fără faze fixe. Din aceste motive, când se folosește procedura semicontinuă, se preferă o concentrație inițială a sedimentelor în suspensie aflată în intervalul inferior al domeniului specificat.

Adăugarea recomandată de substanță de testat presupune că concentrația inițială a substanței de testat nu este depășită de reînnoirea parțială a suspensiei de testat și, prin urmare, se evită adaptarea (care are loc frecvent la o concentrație mare a substanței de testat). Deoarece procedura include atât reinocularea, cât și compensarea nutrienților și substraturilor primare epuizate, diversitatea microbiană originală este refăcută, iar durata testului poate fi extinsă, în principiu, la infinit. Este important de observat că, atunci când se folosește procedura semicontinuă, concentrația reziduală a substanței de testat trebuie să fie corectată în funcție de cantitățile substanței de testat adăugate și îndepărtate la fiecare procedură de reînnoire. Concentrația de substanță de testat totală și dizolvată poate fi folosită alternativ pentru compoziții slab absorbante. Absorbția este nesemnificativă (< 5 %) în condițiile specificate (0,1-1 g solide/l) pentru substanțe cu  $\log K_{ow} < 3$  (valabil pentru compuși neutri și lipofilici). Acest aspect este ilustrat prin următorul exemplu de calcul. 0,1 g/l de solide corespund aproximativ la 10 mg de carbon per litru (fracțiunea de carbon,  $f_C = 0,01$ ). Presupunând că:

$$\log K_{ow} \text{ (din substanța de testat)} = 3$$

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

$$\text{Coeficient de partiție, } K_d = f_C \times K_{oc}$$

atunci fracțiunea dizolvată din concentrația totală C-apă ( $C_w$ )/C-total ( $C_t$ ) este:

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

▼ **M1***Apendicele 3***Determinarea  $^{14}\text{CO}_2$** **Determinarea indirectă a  $^{14}\text{CO}_2$** 

În mod normal, pentru măsurătorile de rutină, metoda indirectă este cea mai rapidă și precisă metodă dacă substanța de testat este nevolatilă și nu se transformă în produși de transformare volatili. Se transferă eșantioane nefiltrate (de 5 ml) în flacoane de scintilație. Un nivel inițial adecvat al activității în eșantioane este de 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), iar activitatea inițială minimă este de aproximativ 1 000 dpm.  $\text{CO}_2$  se elimină după acidifiere la pH 2-3 cu 1-2 picături de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sau HCl concentrat. Eliminarea  $\text{CO}_2$  poate fi efectuată prin barbotare cu aer timp de aproximativ ½-1 oră. Alternativ, flacoanele pot fi agitate cu putere timp de 1-2 ore (de exemplu pe un agitator pentru microplăci) sau lent, peste noapte. Eficiența procedurii de eliminare a  $\text{CO}_2$  se verifică (prin prelungirea perioadei de aerisire sau agitare). Se adaugă apoi un lichid de scintilație adecvat pentru numărarea eșantioanelor apoase, eșantionul se omogenizează pe un mixer turbionar, iar radioactivitatea se determină prin cuantificarea scintilației lichidului, scăzând activitatea de fond determinată în probele martor de testat ( $F_B$ ). Cu excepția cazului când apa de testat este foarte colorată sau conține o concentrație mare de particule, eșantioanele vor manifesta o atenuare uniformă, aceasta fiind suficientă pentru efectuarea corecțiilor atenuării folosind un standard extern. Dacă apa de testat este foarte colorată, corectarea atenuării se poate efectua cu ajutorul adăugării unui standard intern. Dacă concentrația particulelor este mare, nu este posibilă obținerea unei soluții sau gel omogen, variația atenuării între eșantioane fiind mare în caz contrar. În acest caz, poate fi folosită metoda de numărare pentru mălurile de testare, descrisă mai jos. Dacă testul se desfășoară ca test pe sedimente în suspensie, măsurarea  $^{14}\text{CO}_2$  poate avea loc indirect, prin extragerea unui eșantion omogen de 10 ml apă/suspensie de testare și separarea fazelor prin centrifugare la o viteză corespunzătoare (de exemplu la 40 000  $\text{m/s}^2$  timp de 15 minute). Faza apoasă se tratează apoi conform procedurii descrise mai sus. Activitatea  $^{14}\text{C}$  în faza de particule (POA) se determină prin resuspendarea sedimentului într-un volum mic de apă distilată, transferarea în flacoane de scintilație și adăugarea de lichid de scintilație pentru formarea unui gel (în acest scop, sunt disponibile lichide speciale de scintilație). În funcție de natura particulelor (de exemplu conținutul lor de material organic), eșantionul poate fi digerat în timpul nopții cu ajutorul unui dizolvant de țesuturi și apoi omogenizat pe un mixer turbionar înainte de adăugarea lichidului de scintilație. Alternativ, POA poate fi determinat prin combustie în exces de oxigen, folosind un oxidant al eșantionului. Pentru cuantificare, se includ întotdeauna standarde interne, corectarea atenuării putând fi efectuată, dacă este necesar, prin adăugarea unui standard intern pentru fiecare eșantion individual.

**Determinarea directă a  $^{14}\text{CO}_2$** 

Dacă  $^{14}\text{CO}_2$  degajat este măsurat direct, aceasta se realizează prin folosirea unui număr mai mare de recipiente la începutul testului, recoltarea conținutului recipientelor de testare la fiecare punct de măsurare prin acidifierea recipientelor de testare la pH de 2-3 și captarea  $^{14}\text{CO}_2$  într-un absorbant intern (introdus în fiecare recipient de testare la începutul testului) sau extern. Ca mediu absorbant se pot folosi hidroxizi alcalini (de exemplu soluție 1 N de NaOH sau o granulă de NaOH), etanolamină sau absorbant pe bază de etanolamină disponibili în comerț. Pentru măsurarea directă a  $^{14}\text{CO}_2$ , recipientele se astupă (de exemplu cu o membrană din cauciuc butilic).

▼ **M1**

Figura 1a

Exemplu de reprezentare aritmetică a datelor (activitatea reziduală în funcție de timp)

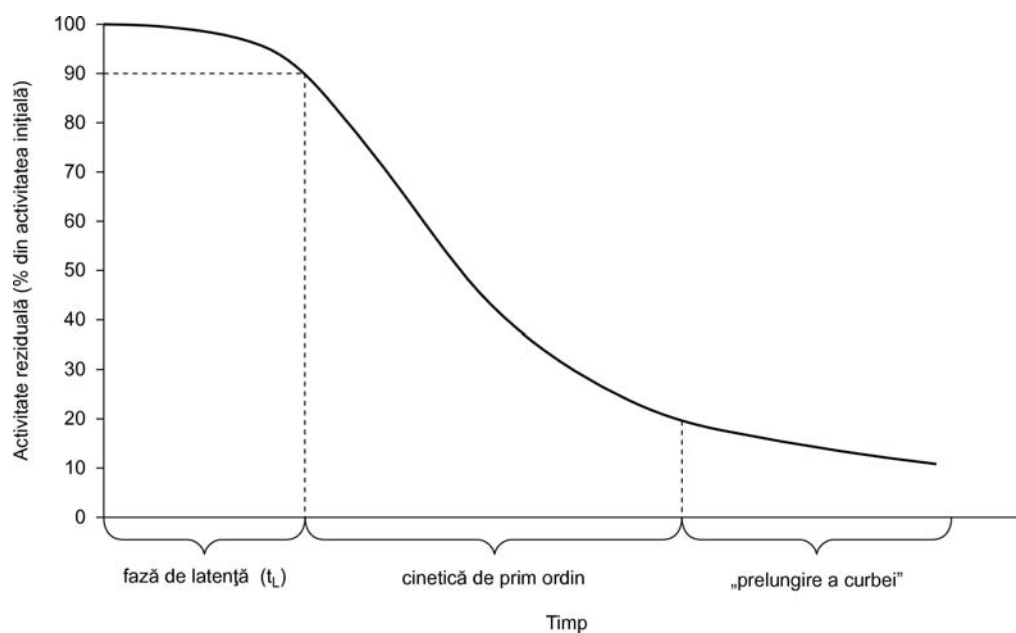
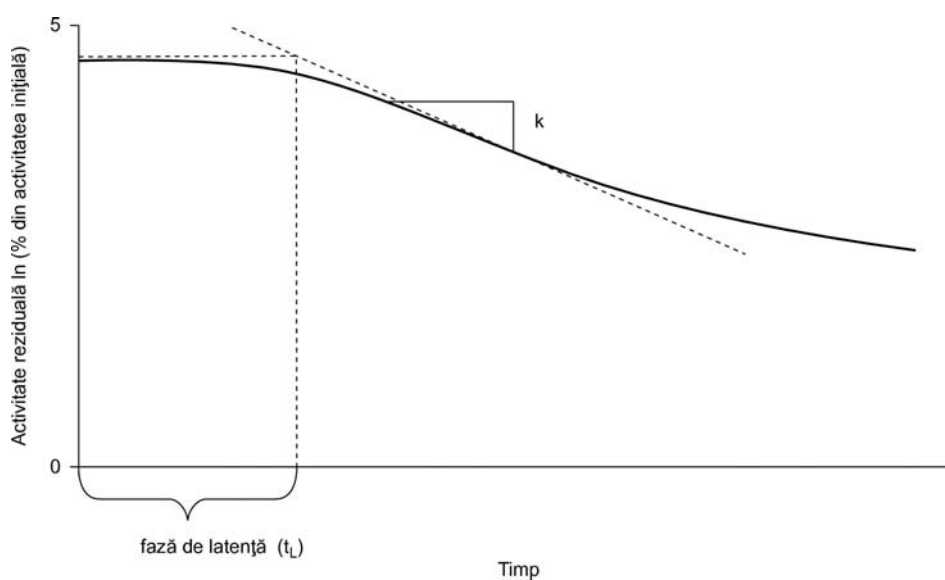


Figura 1b

Exemplu de reprezentare semilogaritmică a datelor (ln al activității reziduale în funcție de timp)



▼ **M6****C.26. TEST DE INHIBARE A CREȘTERII LA SPECIILE DE *LEMNA***

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 221 (2006). Aceasta a fost concepută pentru a evalua toxicitatea substanțelor chimice asupra plantelor acvatice de apă dulce din genul *Lemna* (lintiță). Se bazează pe metodele (1)(2)(3)(4)(5)(6) existente, dar include modificări ale acestor metode pentru a reflecta cercetările și consultările recente asupra unei serii de aspecte-cheie. Prezenta metodă de testare a fost validată printr-un ring test internațional (7).
2. Prezenta metodă de testare descrie testarea toxicității prin folosirea *Lemna gibba* și *Lemna minor*, care au fost ambele studiate pe larg și fac obiectul standardelor menționate mai sus. Taxonomia speciilor de *Lemna* este dificilă, fiind complicată de existența unei game largi de fenotipuri. Deși în cazul *Lemna* se poate manifesta o variabilitate genetică în ceea ce privește răspunsul față de substanțele toxice, în prezent nu există date suficiente despre această sursă de variabilitate pentru a se recomanda folosirea unei anumite clone pentru această metodă de testare. Trebuie reținut că testul nu se desfășoară în condiții axenice, dar sunt luate măsuri de reducere la minimum a contaminării cu alte organisme în timpul procedurii de testare.
3. Sunt descrise detaliile privind testarea cu reînnoire (semistatică și în regim dinamic) și fără reînnoire (statică) a soluției de testare. În funcție de obiectivele testului și de cerințele de reglementare, se recomandă aplicarea metodei semistatice și a metodei dinamice, de exemplu pentru substanțe chimice care se pierd cu rapiditate din soluție ca urmare a volatilizării, fotodegradării, precipitării sau biodegradării. Alte orientări sunt disponibile în referința (8).
4. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

## PRINCIPIUL TESTULUI

5. Culturile de plante cu creștere exponențială din genul *Lemna* se lasă să crească în monoculturi, cu diferite concentrații ale substanței chimice de testare, timp de șapte zile. Obiectivul testului este de a cuantifica efectele substanței chimice asupra creșterii vegetative în această perioadă, pe baza evaluărilor variabilelor de măsurare selectate. Numărul de fronde este variabila de măsurare principală. Se mai măsoară cel puțin încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă), deoarece unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare considerabil mai mult decât numărul de fronde. Pentru cuantificarea efectelor substanței chimice, creșterea în soluțiile de testare se compară cu cea a probelor de control, fiind determinată concentrația care provoacă o inhibare specificată de  $x$  % a creșterii (de exemplu 50 %) și exprimată ca  $EC_x$  (de exemplu  $EC_{50}$ ).
6. Punctul final de testare este inhibarea creșterii, exprimată ca creștere logaritmică a variabilei de măsurare (viteza medie specifică de creștere) în timpul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a vitezei de creștere specificată de  $x$  % (de exemplu 50 %) se determină din vitezele medii specifice de creștere înregistrate pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca  $E_rC_x$  (de exemplu  $E_rC_{50}$ ).
7. O variabilă de răspuns suplimentară folosită în prezenta metodă de testare este randamentul, care poate fi necesar pentru îndeplinirea unor cerințe de reglementare specifice din unele țări. Acesta se definește ca variabilele de măsurare la sfârșitul perioadei de expunere minus variabilele de măsurare la începutul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a randamentului specificată de  $x$  % (de exemplu 50 %) se calculează din randamentul înregistrat pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca  $E_yC_x$  (de exemplu  $E_yC_{50}$ ).

**▼ M6**

8. În plus, concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE**

9. Este necesară o metodă analitică cu sensibilitate specifică pentru cuantificarea substanței chimice în mediul de testare.
10. Informațiile referitoare la substanța chimică de testare, care pot fi utile pentru stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină,  $pK_a$ ,  $K_{ow}$ , presiunea de vapori și biodegradabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea de vapori pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt probabile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în perioada de testare. Aceasta va indica dacă este necesară adoptarea anumitor măsuri pentru limitarea unor astfel de pierderi. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testare sunt incerte, se recomandă ca acestea să fie evaluate în condițiile testului, cum ar fi mediul de cultură, temperatura sau condițiile de iluminare din test.
11. Când controlarea pH-ului mediului de testare are o importanță specială, de exemplu în cursul testării unor metale sau substanțe chimice instabile din punct de vedere hidrolitic, se recomandă adăugarea unui tampon în mediul de cultură (a se vedea punctul 21). Orientări suplimentare privind testarea substanțelor chimice cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (8).

**VALIDITATEA TESTULUI**

12. Pentru ca testul să fie valabil, perioada de dublare a numărului de fronde în proba de control trebuie să fie mai mică de 2,5 zile (60 de ore), corespunzând unei creșteri de aproximativ șapte ori într-o perioadă de șapte zile și unei viteze medii specifice de creștere de  $0,275 \text{ zi}^{-1}$ . Folosind mediul și condițiile de testare descrise în prezenta metodă de testare, acest criteriu poate fi îndeplinit prin folosirea unui test static (5). Se consideră că acest criteriu poate fi îndeplinit și în condiții de testare semistatică și dinamică. Calculul perioadei de dublare este prezentat la punctul 49.

**SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

13. Substanța (substanțele) chimică (chimice) de referință, cum ar fi 3,5-diclorofenol, folosită (folosite) în ring testul internațional (7), poate (pot) fi testată (testate) ca mijloc de verificare a procedurii de testare. Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară mai puțin frecvent, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare.

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură**

14. Toate echipamentele care intră în contact cu mediile de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material chimic inert. Recipientele de sticlă folosite pentru cultură și testare trebuie să fie sterile și curățate de contaminanții chimici care se pot infiltra în mediul de testare. Vasele de testare trebuie să fie suficient de largi pentru ca frondele din diferitele colonii aflate în vasele de control să crească fără a se suprapune la sfârșitul testului. Nu este important dacă rădăcinile ating baza vaselor de testare, dar se recomandă o adâncime minimă de 20 mm și un volum minim de 100 ml în fiecare vas de testare. Tipul de vase de testare nu influențează desfășurarea testului atât timp cât se respectă aceste cerințe. Pot fi folosite pahare de laborator, vase de cristalizare sau plăci Petri din sticlă de dimensiuni corespunzătoare. Vasele de testare trebuie să fie acoperite

**▼ M6**

pentru a se reduce la minimum evaporarea și contaminarea accidentală, permițând în același timp trecerea aerului. Vasele de testare corespunzătoare, în special capacele, trebuie să prevină formarea umbrei sau modificarea caracteristicilor spectrale ale luminii.

15. Culturile și vasele de testare nu se păstrează în același loc. Această condiție poate fi îndeplinită prin folosirea unor încăperi, incubatoare sau camere de creștere care reproduc condițiile de mediu. Iluminarea și temperatura trebuie să fie controlabile și menținute la un nivel constant (a se vedea punctele 35-36).

**Organismul de testare**

16. Organismul folosit pentru acest test este *Lemna gibba* sau *Lemna minor*. Scurte descrieri ale speciilor de lintiță care au fost folosite pentru testarea toxicității sunt prezentate în apendicele 2. Plantele pot fi obținute dintr-o colecție de culturi, de la un alt laborator sau de pe teren. Dacă sunt colectate de pe teren, plantele se mențin în cultură într-un mediu identic cu cel folosit pentru testare timp de cel puțin opt săptămâni înainte de utilizare. Terenurile de pe care s-au colectat culturile inițiale trebuie să fie lipsite de surse evidente de contaminare. Dacă au fost obținute de la un alt laborator sau dintr-o colecție de culturi, se vor menține în condiții similare timp de cel puțin trei săptămâni. Sursa plantelor, a speciilor și a clonei (dacă se cunoaște) folosite pentru testare se raportează întotdeauna.
17. Se vor folosi monoculturi care sunt vizibil necontaminate cu alte organisme, cum ar fi alge sau protozoare. Plantele sănătoase de *L. minor* vor consta în colonii cuprinzând între două și cinci fronde, în timp ce coloniile sănătoase de *L. gibba* pot conține până la șapte fronde.
18. Calitatea și uniformitatea plantelor folosite pentru testare vor avea o influență semnificativă asupra rezultatului testului și, prin urmare, se vor selecta cu atenție. Se vor folosi plante tinere, cu creștere rapidă, fără leziuni sau decolorări vizibile (cloroză). Culturile de bună calitate sunt indicate de numărul mare de colonii cuprinzând cel puțin două fronde. Un număr mare de fronde unice indică stres ambiental, cum ar fi o cantitate redusă de nutrienți, iar plantele din astfel de culturi nu se folosesc pentru testare.

**Cultivarea**

19. În scopul reducerii frecvenței de întreținere a culturii (de exemplu în situațiile în care nu sunt prevăzute teste cu *Lemna* pentru o anumită perioadă), culturile pot fi menținute în condiții de iluminare și temperatură scăzută (4-10 °C). Detalii privind culturile sunt prezentate în apendicele 3. Semnele vizibile de contaminare cu alge sau alte organisme pot necesita sterilizarea la suprafață a unui subeșantion de fronde de *Lemna*, urmată de transferul către un mediu proaspăt (a se vedea apendicele 3). În această situație, restul culturii contaminate se elimină.
20. Cu cel puțin șapte zile înainte de testare, se transferă un număr suficient de colonii în condiții aseptice într-un mediu steril proaspăt și se cultivă timp de 7-10 zile în condițiile de testare.

**Mediul de testare**

21. Pentru *Lemna minor* și *Lemna gibba* se recomandă medii diferite, conform descrierii de mai jos. Se va examina cu atenție includerea unui tampon de pH în mediul de testare [MOPS (acid 4-morfolinpropan-sulfonic, nr. CAS: 1132-61-2) în mediul *L. minor* și de NaHCO<sub>3</sub> în mediul *L. gibba*] când se suspectează că va reacționa cu substanța chimică de testare și va influența exprimarea toxicității acesteia. Mediul Steinberg (9) este de asemenea acceptabil dacă se îndeplinesc criteriile de validitate.



▼ **M6**

22. Pentru cultura și testarea cu *L. minor* se recomandă o modificare a mediului de cultură a *Lemna* prevăzut de standardul suedez (SIS). Compoziția acestui mediu este prezentată în apendicele 4.
23. Mediul de cultură 20X-AAP, descris în apendicele 4, este recomandat pentru cultivarea și testarea cu *L. gibba*.
24. Mediul Steinberg descris în apendicele 4 este, de asemenea, adecvat pentru *L. minor*, dar poate fi folosit și pentru *L. gibba* dacă se îndeplinesc criteriile de validitate.

**Soluții de testare**

25. Soluțiile de testare se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc ale substanțelor chimice de testat se prepară în general prin dizolvarea substanței chimice în mediul de cultură.
26. Concentrația cea mai mare testată a substanței chimice de testare nu trebuie să depășească de preferință limita de solubilitate în apă a substanței chimice în condițiile de testare. Cu toate acestea, trebuie remarcat că speciile de *Lemna* plutesc la suprafață și pot fi expuse la substanțe chimice care se acumulează la interfața apă-aer (de exemplu substanțe chimice cu solubilitate scăzută în apă, hidrofobe sau tensioactive). În astfel de circumstanțe, expunerea va rezulta de la alte materiale decât cele din soluție, iar concentrațiile de testare pot depăși nivelul de solubilitate în apă, în funcție de caracteristicile substanței chimice de testare. În cazul substanțelor chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrate sau dispersia substanței chimice folosind un solvent sau agent de dispersie organic, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță chimică de testare în mediul de testare și a favoriza dispersia și dizolvarea sa. Se vor depune toate eforturile pentru evitarea folosirii unor astfel de materiale. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, printre solvenții obișnuiți care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l se numără acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la minimum ( $\leq 100$  µl/l), iar toate tratamentele și probele de control trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau agent de dispersie. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prezentate în referința (8).

**Grupurile de testare și de control**

27. Cunoașterea prealabilă a toxicității substanței chimice de testare față de *Lemna*, de exemplu în urma unui test de stabilire a intervalului, va permite alegerea concentrațiilor potrivite de testare. În testul final de stabilire a toxicității trebuie să existe în mod normal cel puțin cinci concentrații de testare dispuse în serie geometrică. Se preferă ca factorul de separare între concentrațiile de testare să nu depășească 3,2, dar se poate folosi o valoare mai mare în cazul în care curba concentrație-răspuns este plată. Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Pentru fiecare concentrație de testare se folosesc cel puțin trei probe duplicate.
28. La stabilirea intervalului de concentrații de testare (pentru testul de stabilire a intervalului și/sau testul final de stabilire a toxicității), trebuie să se rețină următoarele:
  - pentru determinarea unei  $EC_x$ , concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea  $EC_x$  în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează  $EC_{50}$ , concentrația cea mai mare testată trebuie să fie mai mare decât valoarea  $EC_{50}$ . Dacă valoarea  $EC_{50}$  se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă;
  - dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC, concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută, astfel încât creșterea să nu fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare, astfel încât creșterea să fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. Dacă

**▼ M6**

nu este cazul, testul se va repeta folosind un interval diferit de concentrații (cu excepția cazului în care concentrația cea mai mare se află la limita solubilității sau la concentrația-limită maximă cerută, de exemplu 100 mg/l).

29. Fiecare test trebuie să includă probe de control constând în mediu nutritiv, număr de fronde și colonii, condiții de mediu și proceduri identice celor din vasele de testare, dar fără substanța chimică de testare. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie suplimentar, se va include o tratare suplimentară a probei de control cu acest solvent/agent de dispersie, prezent în aceeași concentrație cu cea din vasele cu substanța chimică de testare. Numărul vaselor de control duplicate (și vasele cu solvenți, dacă este cazul) trebuie să fie cel puțin egal cu numărul de vase folosite pentru fiecare concentrație de testare; în mod ideal acest număr va fi de două ori mai mare.
30. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, testul poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație. Cu toate acestea, numărul de probe duplicat de control trebuie să fie de cel puțin trei.

**Expunere**

31. Coloniile constând în 2-4 fronde vizibile se transferă din cultura de inocul și se distribuie aleatoriu în vasele de testare în condiții aseptice. Fiecare vas de testare va conține un total de 9-12 fronde. Numărul de fronde și colonii va fi același în fiecare vas de testare. Experiența dobândită în urma aplicării acestei metode și a ring testului a indicat că folosirea a trei probe duplicat per tratament, fiecare probă duplicat conținând inițial 9-12 fronde, este suficientă pentru a detecta diferențe de creștere de aproximativ 4-7 % inhibare calculată în funcție de viteza de creștere (10-15 % calculată în funcție de randament) între tratamente (7).
32. Vasele de testare vor fi poziționate aleatoriu în incubator pentru a se minimiza influența diferențelor spațiale de intensitate a luminii sau de temperatură. Este nevoie, de asemenea, de o dispunere fixă sau aleatorie a vaselor (sau o re poziționare mai frecventă) atunci când se fac observații.
33. Dacă un test preliminar de stabilitate arată că nu poate fi menținută concentrația substanței chimice de testat (concentrația măsurată scade sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe durata perioadei de testare (7 zile), se recomandă un test semistatic. În acest caz, coloniile se expun unor soluții proaspăt preparate de testare și de control de cel puțin două ori în timpul testului (de exemplu ziua 3 și ziua 5). Frecvența expunerii la un mediu proaspăt va depinde de stabilitatea substanței chimice de testare; pentru menținerea concentrațiilor cât mai aproape de nivelul constant în cazul substanțelor chimice foarte instabile sau volatile, poate fi necesară o frecvență mai mare. În unele situații poate fi necesară o procedură dinamică (8)(10).
34. Scenariul de expunere prin aplicare foliară (pulverizare) nu este inclus în prezenta metodă de testare. Pentru aceasta, a se vedea referința (11).

**Condiții de incubare**

35. Se va utiliza o lumină fluorescentă albă, caldă sau rece, continuă pentru a asigura o intensitate luminoasă cuprinsă în intervalul  $85-135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  atunci când este măsurată în radiație activă fotosintetică (400-700 nm) în puncte aflate la distanțe egale de sursa de lumină cu distanțele la care se află frondele de *Lemna* (echivalent cu 6 500-10 000 lucși). Diferențele față de intensitatea luminoasă selectată în zona de testare nu trebuie să depășească  $\pm 15 \%$ . Metoda de detectare și măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va influența valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumina din

**▼ M6**

toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare) și senzorii „cosinus” (care răspund la lumina din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.

36. Temperatura din vasele de testare trebuie să fie de  $24 \pm 2$  °C. pH-ul mediului de control nu trebuie să aibă o creștere mai mare de 1,5 unități în timpul testului. O deviație de peste 1,5 unități nu va invalida totuși testul dacă se poate demonstra întrunirea criteriilor de validitate. Se va acorda o atenție sporită devierii pH-ului în cazuri speciale, cum ar fi în timpul testării de substanțe chimice sau metale instabile. Pentru orientări suplimentare, a se vedea referința (8).

**Durata**

37. Testul se încheie după 7 zile de la transferul plantelor în vasele de testare.

**Măsurători și determinări analitice**

38. Numărul de fronde din vasele de testare se determină și se consemnează la începutul testului, acordându-se atenție înregistrării frondelor proeminente și distincte. Numărul de fronde cu aspect normal sau anormal se stabilește la începutul testului, cel puțin o dată la fiecare trei zile în timpul perioadei de expunere (adică cel puțin de două ori în timpul perioadei de 7 zile), precum și la încheierea testului. Se înregistrează modificările în dezvoltarea plantei, cum ar fi dimensiunea frondei, aspectul, indicațiile de necroză, cloroză sau giboziitate, separarea coloniilor sau pierderea de flotabilitate, precum și cele privind lungimea și aspectul rădăcinii. Se înregistrează, de asemenea, caracteristici semnificative ale mediului de testare (de exemplu prezența de material nedizolvat, creșterea de alge în vasul de testare).

39. Pe lângă determinările numărului de fronde în timpul testului, se evaluează și efectele substanțelor chimice de testare asupra uneia (sau mai multora) dintre următoarele variabile de măsurare:

(i) suprafața totală a frondelor;

(ii) greutatea uscată;

(iii) greutatea în stare proaspătă.

40. Suprafața totală a frondelor are avantajul de a putea fi determinată pentru fiecare vas de testare și de control la începutul, în timpul și la sfârșitul testului. Greutatea uscată sau în stare proaspătă se determină la începutul testului, pe baza unui eșantion al culturii de inocul reprezentativ pentru substanța folosită la începutul testului și la sfârșitul testului, pe baza materialului din fiecare vas de testare și de control. Dacă suprafața frondelor nu se măsoară, se preferă greutatea uscată în locul greutății în stare proaspătă.

41. Suprafața totală a frondelor, greutatea uscată și greutatea în stare proaspătă se determină după cum urmează:

(i) *Suprafața totală a frondelor*: suprafața totală a frondelor din toate coloniile poate fi determinată prin analiza imaginilor. Se capturează o imagine a vasului de testare și a plantelor cu ajutorul unei camere video (de exemplu, prin așezarea vasului pe o cutie iluminată), iar imaginea rezultată se prelucrează digital. Suprafața totală a frondelor dintr-un vas de testare se poate determina apoi prin calibrare cu forme plane de arie cunoscută. Trebuie acordată atenție excluderii interferențelor provocate de marginea vasului de testare. O metodă alternativă mai complicată constă în fotocopierea vasului de testare și a plantelor, decuparea siluetei rezultate a coloniilor și determinarea suprafeței lor folosind un analizor al suprafeței frunzelor sau hârtie milimetrică. Alte tehnici (de exemplu raportul dintre greutatea hârtiei corespunzătoare suprafeței siluetei coloniilor și greutatea hârtiei corespunzătoare suprafeței unei unități) pot fi, de asemenea, utile.

## ▼ M6

- (ii) *Greutatea uscată*: se colectează toate coloniile din vasele de testare și se clătesc cu apă distilată sau deionizată. Se înlătură excesul de apă și se usucă la 60 °C, până se atinge o greutate constantă. Se includ toate fragmentele de rădăcină. Greutatea uscată se exprimă cu o precizie de cel puțin 0,1 mg.
- (iii) *Greutatea în stare proaspătă*: se transferă toate coloniile în tuburi de polistiren (sau alt material inert) precântărite, cu fund rotunjit care prezintă mici orificii (1 mm). Tuburile se centrifughează apoi la 3 000 rpm la temperatura camerei, timp de 10 minute. Tuburile, care conțin acum coloniile uscate, se recântăresc, iar greutatea în stare proaspătă se calculează prin scăderea greutății tubului gol.

## Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice

- 42. Dacă se folosește un test static, pH-ul fiecărui tratament se măsoară la începutul și la sfârșitul testului. Dacă se folosește un test semistatic, pH-ul se măsoară în fiecare lot de soluție de testare „proaspătă” înainte de fiecare reînnoire, precum și în soluțiile „uzate” corespunzătoare.
- 43. Intensitatea luminoasă se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte aflate la distanțe de sursa de lumină identice cu cele ale frondelor de *Lemna*. Măsurătorile se fac cel puțin o dată în timpul testului. Temperatura mediului dintr-un vas înlocuitor menținut în condiții identice în încăperea, incubatorul sau camera de creștere se măsoară cel puțin o dată pe zi.
- 44. Concentrațiile substanței chimice de testat se determină la intervale corespunzătoare în timpul testului. În testele statice, cerința minimă este de a determina concentrațiile la începutul și la sfârșitul testului.
- 45. Pentru testele semistatice în care nu se estimează menținerea concentrației substanței chimice de testare în limita a  $\pm 20\%$  din cea nominală, este necesară analizarea tuturor soluțiilor de testare proaspăt preparate și aceleași soluții la fiecare reînnoire (a se vedea punctul 33). Cu toate acestea, pentru testele în care concentrația inițială măsurată a substanței chimice de testare nu se situează în limita a  $\pm 20\%$  din cea nominală, dar se pot aduce dovezi suficiente care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (adică în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinările chimice se vor efectua doar la concentrațiile de testare cele mai mari și cele mai scăzute. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare înainte de reînnoire trebuie efectuată doar la un vas duplicat la fiecare concentrație de testare (sau la conținutul vaselor combinate în funcție de proba duplicat).
- 46. Dacă se folosește un test în regim dinamic, se recomandă un regim de recoltare a eșantioanelor similar cu cel descris pentru testele semistatice, inclusiv analiza la începutul, mijlocul și sfârșitul testului, dar măsurarea soluțiilor „uzate” nu este adecvată în acest caz. La aceste tip de test, trebuie verificat zilnic debitul diluantului și al substanței chimice de testare sau al soluției stoc a substanței chimice de testare.
- 47. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a  $\pm 20\%$  din cea nominală sau cea măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial nu se află în limita a  $\pm 20\%$ , este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau de modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare (8).

▼ **M6****Test la valori-limită**

48. În unele condiții, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanța chimică de testare nu are efecte toxice la concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita solubilității sale în mediul de testare (oricare dintre ele este mai scăzută), se poate realiza un test la valori-limită, care presupune compararea răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analizarea concentrației de expunere. Unui test la valori-limită i se aplică toate condițiile de testare și criteriile de validitate descrise anterior, cu excepția faptului că numărul de probe duplicat supuse tratamentului trebuie să fie dublu. Creșterea în grupul de control și în cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic de comparare a mediilor, cum ar fi un test-t (Student).

**DATE ȘI RAPORT****Timp de duplicare**

49. Pentru determinarea timpului de duplicare ( $T_d$ ) a numărului de fronde și asigurarea respectării de către studiu a acestui criteriu de validitate (punctul 12), se utilizează următoarea formulă cu datele obținute de la vasele de control:

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

unde  $\mu$  este viteza medie specifică de creștere determinată conform descrierii de la punctele 54-55.

**Variabile de răspuns**

50. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testat asupra creșterii vegetative a *Lemna*. Prezenta metodă de testare descrie două variabile de răspuns, deoarece diferitele jurisdicții au preferințe și cerințe de reglementare diferite. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile în toate jurisdicțiile, efectele se evaluează folosind ambele variabile de răspuns (a) și (b) descrise mai jos.

(a) *Viteza medie specifică de creștere*: această variabilă de răspuns se calculează pe baza modificărilor logaritmilor numerelor de fronde și, în plus, pe baza modificărilor logaritmilor unui alt parametru de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) în funcție de timp (exprimat în zile) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Este numită uneori viteză relativă de creștere (12).

(b) *Randamentul*: această variabilă de răspuns se calculează pe baza modificărilor numărului de fronde și, în plus, pe baza modificărilor unui alt parametru de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului, până la finalul testului.

51. Trebuie remarcat că valorile de toxicitate calculate prin folosirea acestor două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență trebuie să fie recunoscută când se folosesc rezultatele testului. Valorile  $EC_x$  bazate pe viteza medie specifică de creștere ( $E_r C_x$ ) vor fi în general mai mari decât rezultatele bazate pe randament ( $E_y C_x$ ) în cazul în care condițiile de testare din prezenta metodă de testare sunt respectate, ca urmare a bazei matematice a abordărilor respective. Aceasta nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic. Conceptul de viteză medie specifică de creștere se bazează pe modelul general al creșterii exponențiale a lintiței în culturi nelimitate, în care toxicitatea se estimează pe baza efectelor asupra vitezei de creștere, fără a fi dependentă de nivelul absolut al vitezei specifice de creștere a probei de control, de panta curbei concentrație-răspuns sau de durata testului. Prin contrast, rezultatele bazate pe variabila de răspuns privind randamentul depind de toate aceste alte variabile.  $E_y C_x$  depinde de viteza specifică de creștere a speciilor de lintiță folosite pentru fiecare test și

▼ **M6**

de viteză maximă specifică de creștere, care poate varia între specii și chiar între clone diferite. Această variabilă de răspuns nu se folosește pentru compararea sensibilității la substanțe toxice între speciile de lăntiță și chiar clone diferite. În timp ce folosirea vitezei medii specifice de creștere în scopul estimării toxicității este preferată din punct de vedere științific, estimările de toxicitate bazate pe randament sunt, de asemenea, incluse în prezenta metodă de testare pentru a satisface cerințele de reglementare actuale din unele jurisdicții.

52. Estimările toxicității trebuie să se bazeze pe numărul de fronde și pe o variabilă de măsurare suplimentară (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă), deoarece unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare în proporție considerabil mai mare decât o poate face numărul de fronde. Acest efect nu va putea fi detectat exclusiv în urma calculării numărului de fronde.
53. Numărul de fronde, precum și orice altă variabilă de măsurare înregistrată, cum ar fi suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă, sunt introduse într-un tabel împreună cu concentrațiile substanței chimice de testare cu ocazia fiecărei măsurări. Analiza ulterioară a datelor, de exemplu pentru estimarea LOEC, NOEC sau a  $EC_x$  trebuie să se bazeze pe valorile probelor duplicate individuale, și nu pe mediile calculate pentru fiecare grup supus tratamentului.

#### **Viteza medie specifică de creștere**

54. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a variabilelor de creștere – numărul de fronde și încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) – pe baza formulei de mai jos pentru fiecare probă duplicat a probelor de control și a probelor supuse tratamentului:

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

unde:

- $\mu_{i-j}$ : viteza medie specifică de creștere de la momentul i la momentul j
- $N_i$ : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul i
- $N_j$ : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j
- t: perioada de timp cuprinsă între momentele i și j

Pentru fiecare grup supus tratamentului și pentru fiecare grup de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările varianței.

55. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimările varianței. În plus, viteza de creștere pe secțiuni se evaluează în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se produc în timpul perioadei de expunere (de exemplu prin verificarea curbilor de creștere transformate logaritmice). Diferențe substanțiale între viteza de creștere pe secțiuni și viteza medie de creștere indică o deviere de la creșterea exponențială constantă și impun verificarea atentă a curbilor de creștere. În acest caz, o abordare conservativă constă în compararea vitezelor specifice de creștere ale culturilor tratate în timpul perioadei de timp de inhibare maximă cu cele ale probelor de control, în aceeași perioadă.
56. Astfel, procentajul de inhibare a vitezei de creștere ( $I_i$ ) se poate calcula pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarelor formule:

**▼ M6**

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

unde:

- %I<sub>r</sub>: procentajul de inhibare a vitezei medii specifice de creștere
- μ<sub>C</sub>:: valoarea medie a μ în grupul de control
- μ<sub>T</sub>:: valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

**Randamentul**

57. Efectele asupra randamentului se determină pe baza a două variabile de măsurare, numărul de fronde și încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) prezentă în fiecare vas de testare la începutul și la sfârșitul testului. În cazul greutății uscate sau al greutății în stare proaspătă, biomasa inițială se determină pe baza unui eșantion de fronde recoltat din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare (a se vedea punctul 20). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările varianței. Procentajul mediu de inhibare a randamentului (% I<sub>y</sub>) se poate calcula pentru fiecare grup supus tratamentului după cum urmează:

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

unde:

- % I<sub>y</sub>: procentajul de reducere a randamentului
- b<sub>C</sub>: biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control
- b<sub>T</sub>: biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul supus tratamentului

**Reprezentarea grafică a curbilor concentrație-răspuns**

58. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentajului de inhibare a variabilei de răspuns (I<sub>r</sub> sau I<sub>y</sub> calculată conform descrierii de la punctul 56 sau 57) și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

**Estimarea EC<sub>x</sub>**

59. Estimările EC<sub>x</sub> (de exemplu EC<sub>50</sub>) trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere (E<sub>r</sub>C<sub>x</sub>), cât și pe randament (E<sub>y</sub>C<sub>x</sub>), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe numărul de fronde și o variabilă de măsurare suplimentară (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă). Aceasta se justifică deoarece există substanțe chimice de testare care au efecte diferite asupra numărului de fronde și a altor variabile de măsurare. Parametrii de toxicitate doriți sunt, prin urmare, patru valori de EC<sub>x</sub> pentru fiecare nivel de inhibare x calculat: E<sub>r</sub>C<sub>x</sub> (numărul de fronde); E<sub>r</sub>C<sub>x</sub> (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau suprafața în stare proaspătă); E<sub>y</sub>C<sub>x</sub> (numărul de fronde); și E<sub>y</sub>C<sub>x</sub> (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau suprafața în stare proaspătă).

*Proceduri statistice*

60. Obiectivul este de a obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în unități probit, logit sau Weibull (13), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile regulate. Când se apropie de zero sau inhibiție totală, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (13). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformatele probit, logit sau Weibull se folosesc în cazul datelor



▼ **M6**

binare (de exemplu date privind mortalitatea sau supraviețuirea) și trebuie să fie modificate pentru a reflecta datele privind viteza de creștere și randamentul. Proceduri specifice de determinare a valorilor  $EC_x$  pe baza datelor continue se găsesc în referințele (14), (15) și (16).

61. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor  $EC_x$ . Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supuse tratamentului.
62. Estimările și limitele de încredere ale  $EC_{50}$  pot fi obținute și folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (17), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.
63. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor de tratare folosind tehnici de analiză a varianței (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară apoi cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau cel al lui Williams pot fi utile în acest sens (18)(19)(20)(21). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a varianței se verifică. Această evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (22). Teste adecvate sunt cele ale lui Levene sau Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a varianțelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea varianței este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analizarea prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC se găsesc în referința (16).
64. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de a abandona conceptul de NOEC și înlocuirea sa cu estimări punctuale ale  $EC_x$  bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a  $x$  pentru acest test cu *Lemma*. Totuși un interval de 10-20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabilele de răspuns alese) și, de preferat, se raportează atât  $EC_{10}$ , cât și  $EC_{20}$ .

**Raportare**

65. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică de testare*

- starea fizică și proprietățile fizico-chimice, inclusiv limita solubilității în apă;
- datele de identificare a substanței chimice (de exemplu numărul CAS), inclusiv puritatea (impurități).

*Specia de testare:*

- denumirea științifică, clona (dacă se cunoaște) și sursa.

*Condiții de testare:*

- procedura de testare folosită (statică, semistatică sau în regim dinamic);
- data începerii testului și durata sa;
- mediul de testare;
- descrierea proiectării testului: vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, numărul de colonii și fronde per vas de testare la începutul testului;
- concentrațiile de testare (nominale și măsurate, după caz) și numărul de probe duplicat per concentrație;



▼ **M6**

- metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie;
- temperatura în timpul testului;
- sursa de lumină, intensitatea luminoasă și omogenitatea;
- valorile pH-ului mediilor de testare și de control;
- concentrațiile substanței chimice de testare și metoda de analiză cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, deviații standard sau limite de încredere ale analizelor);
- metodele de determinare a numărului de fronde și a altor variabile de măsurare, cum ar fi greutatea uscată, greutatea în stare proaspătă sau suprafața frondelor;
- orice abatere de la prezenta metodă de testare.

*Rezultate:*

- date brute: numărul de fronde și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control, cu ocazia fiecărei observări și analize;
- media și deviația standard pentru fiecare variabilă de măsurare;
- curbele de creștere pentru fiecare concentrație (recomandate cu variabila de măsurare transformată logaritmic, a se vedea punctul 55);
- timpul de duplicare/viteza de creștere în proba de control, pe baza numărului de fronde;
- variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;
- reprezentarea grafică a relației concentrație-efect;
- estimări ale punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, cum ar fi EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub>, și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;
- dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);
- orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;
- orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observările soluțiilor de testare;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) 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.
- (2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼ **M6**

- (5) 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.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) 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.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) 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.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (20) 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.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, 519-531.
- (22) 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.

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții**

În sensul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții și prescurtări:

„**Biomasă**” înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație. În acest test, se măsoară de obicei înlocuitorii pentru biomasă, cum ar fi numărul de fronde sau suprafața frondelor, iar folosirea termenului „biomasă” se referă așadar și la măsurarea acestor înlocuitori.

„**Substanță chimică**” înseamnă o substanță sau un amestec.

„**Cloroză**” înseamnă îngălbenirea țesutului frondei.

„**Clonă**” înseamnă un organism sau o celulă provenind de la un singur individ prin reproducere asexuată. Indivizii din aceeași clonă sunt, prin urmare, identici din punct de vedere genetic.

„**Colonie**” înseamnă un agregat de fronde mamă și fiică (de obicei 2-4) atașate unele de altele. Uneori, este denumită plantă.

„**EC<sub>50</sub>**” înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu 50 %) a creșterii *Lemna* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau randament, se folosesc simbolurile „E<sub>50</sub>C” pentru viteza de creștere, respectiv „E<sub>50</sub>C” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E<sub>50</sub>C (numărul de fronde).

„**Test în regim dinamic**” înseamnă un test în care soluțiile de testare sunt înlocuite continuu.

„**Fronă**” înseamnă structura individuală/unică având formă de frunză a unei plante de lîntiță. Este cea mai mică unitate (individ) capabilă de reproducere.

„**Gibozitate**” înseamnă fronde care prezintă o proeminență sau umflătură.

„**Creștere**” înseamnă o sporire a variabilei de măsurare, cum ar fi numărul de fronde, greutatea uscată, greutatea umedă sau suprafața frondelor, în perioada de testare.

„**Viteză de creștere**” (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere.

„**Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)**” înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la  $p < 0,05$ ) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Toate concentrațiile testate mai mari decât LOEC trebuie să aibă totuși efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Dacă aceste două condiții nu pot fi satisfăcute, se va furniza o explicație completă privind modul în care a fost selectat LOEC (și, prin urmare, NOEC).

„**Variabile de măsurare**” înseamnă orice tip de variabilă care se măsoară pentru a exprima punctul final de testare prin folosirea uneia sau a mai multor variabile de răspuns diferite. În prezenta metodă, numărul de fronde, suprafața frondelor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată sunt variabile de măsurare.

„**Monocultură**” înseamnă o cultură cu o singură specie de plante.

„**Necroză**” înseamnă un țesut de frondă mort (alb sau îmbibat cu apă).

„**Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC)**” înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

„**Fenotip**” înseamnă caracteristica observabilă a unui organism determinată de interacțiunea genelor sale cu mediul său înconjurător.

„**Variabilă de răspuns**” înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. În cazul prezentei metode de testare, vitezele de creștere și randamentul reprezintă variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum numărul de fronde, suprafața frondelor, greutatea în stare proaspătă sau greutatea uscată.

**▼ M6**

„**Test (de reînnoire) semistatic**” înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durata testului.

„**Test static**” înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durata testului.

„**Substanță chimică de testare**” înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

„**Punctul final de testare**” descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În prezenta metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

„**Mediu de testare**” înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care plantele testate cresc când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

„**Randament**” înseamnă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere.

▼ **M6***Apendicele 2***Descrierea *Lemna* spp.**

Planta acvatică denumită uzual lintiță, *Lemna* spp., aparține familiei *Lemnaceae*, care conține un număr de specii grupate în patru genuri, răspândite în întreaga lume. Aspectul și taxonomia lor variate au fost descrise pe larg (1)(2). *Lemna gibba* și *L. minor* sunt specii reprezentative pentru zonele temperate, fiind folosite în mod obișnuit pentru teste de toxicitate. Ambele specii au o tulpină discoidală plutitoare sau submersă (frondă) și o rădăcină foarte subțire provenind din centrul suprafeței inferioare a fiecărei fronde. Speciile de *Lemna* înfloresc rareori, iar plantele se reproduc prin înmulțire vegetativă, producând fronde noi (3). În comparație cu plantele mai în vârstă, cele tinere tind să fie mai deschise la culoare, au rădăcini mai scurte și 2-3 fronde de dimensiuni diferite. Datorită dimensiunii reduse a *Lemna*, structurii sale simple, reproducerii asexuate și duratei scurte a unei generații, plantele din acest gen sunt adecvate în mare măsură pentru testele de laborator (4)(5).

Ca urmare a variației probabile între specii în ceea ce privește sensibilitatea, sunt valide doar comparațiile de sensibilitate realizate în cadrul aceleiași specii.

Exemple de specii de *Lemna* folosite pentru testare: Referințe bibliografice privind speciile

*Lemna aequinotialis*: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinotialis* 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 (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (în limba suedeză).

*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 (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

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

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

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

Surse de specii de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria  
Department of Botany, University of Toronto  
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2  
Tel: +1-416-978-3641  
Fax: +1-416-978-5878  
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼ **M6**

North Carolina State University  
 Forestry Dept  
 Duckweed Culture Collection  
 Campus Box 8002  
 Raleigh, NC 27695-8002  
 Statele Unite ale Americii  
 phone 001 (919) 515-7572  
 astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University  
 SE-106 91  
 STOCKHOLM  
 SUEDE  
 Tel: +46 8 674 7240  
 Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)  
 FG III 3.4  
 Schichauweg 58  
 12307 Berlin  
 Germania  
 e-mail: lemna@uba.de

## BIBLIOGRAFIE

- (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.

**▼ M6***Apendicele 3***Întreținerea culturii stoc**

Culturile stoc pot fi păstrate la temperaturi scăzute (4-10 °C) pentru perioade îndelungate de timp, fără a fi necesară refacerea. Mediul de cultură al *Lemna* poate fi identic cu cel folosit pentru testare, dar pentru culturile stoc pot fi folosite alte medii bogate în substanțe nutritive.

Un număr de plante tinere, de culoare verde-deschis, se transferă periodic, folosind o tehnică aseptică, în vase noi de cultură care conțin un mediu proaspăt. În condițiile de temperatură scăzută descrise anterior, subcultivarea poate avea loc la intervale de până la trei luni.

Se folosesc vase de cultură din sticlă, curate din punct de vedere chimic (curățate cu acid) și sterile, precum și tehnici de manipulare aseptică. În cazul contaminării culturii stoc, de exemplu cu alge sau ciuperci, se iau măsuri pentru eliminarea organismelor contaminante. În cazul algelor și al majorității celorlalte organisme contaminante, eliminarea are loc prin sterilizare de suprafață. Se recoltează un eșantion de material vegetal contaminat și se taie rădăcinile. Materialul se agită apoi energic în apă curată și se introduce într-o soluție de hipoclorit de sodiu 0,5 % (v/v) pentru o perioadă cuprinsă între 30 de secunde și 5 minute. Materialul vegetal se clătește apoi cu apă sterilă și se transferă, sub formă de loturi, în vase de cultură conținând mediu de cultură proaspăt. Un număr mare de fronde vor muri ca urmare a acestui tratament, în special dacă se folosesc perioade de expunere mai lungi, dar unele dintre cele care supraviețuiesc vor fi de obicei necontaminate. Acestea pot fi folosite ulterior pentru reinocularea noilor culturi.

▼ **M6***Apendicele 4***Medii**

Pentru *L. minor* și *L. gibba* se recomandă medii de cultură diferite. În cazul *L. Minor* se recomandă un mediu modificat conform standardului suedez (SIS), în timp ce pentru *L. gibba* se recomandă mediul 20X AAP. Compozițiile ambelor medii sunt prezentate mai jos. Pentru pregătirea acestor medii se folosesc reactivi sau substanțe chimice de puritate analitică și apă deionizată.

**Mediul de cultură pentru *Lemna* conform standardului suedez (SIS)**

- Soluțiile stoc I-V se sterilizează prin autoclavare (120 °C, 15 minute) sau prin filtrare prin membrană (diametrul porilor de aproximativ 0,2 μm).
- Soluțiile stoc VI (și, opțional, VII) se sterilizează exclusiv prin filtrare prin membrană; nu se supun autoclavării.
- Soluțiile stoc sterile se păstrează la întuneric și temperatură scăzută. Soluțiile stoc I-V se elimină după șase luni, în timp ce soluțiile stoc VI (și, opțional, VII) au o perioadă de valabilitate de o lună.

| Soluția stoc nr.: | Substanța   | Concentrația în soluția stoc (g/l) | Concentrația în mediul preparat (mg/•l) | Mediul preparat |                      |
|-------------------|---|------------------------------------|---|-----------------|----------------------|
|                   |   |                                    |   | Element         | Concentrație (mg/•l) |
| I                 | NaNO <sub>3</sub>                                     | 8,50                               | 85                                      | Na; N           | 32; 14               |
|                   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1,34                               | 13,4                                    | K; P            | 6,0; 2,4             |
| II                | MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 15                                 | 75                                      | Mg; S           | 7,4; 9,8             |
| III               | CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                 | 7,2                                | 36                                      | Ca; Cl          | 9,8; 17,5            |
| IV                | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                       | 4,0                                | 20                                      | C               | 2,3                  |
| V                 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 1,0                                | 1,00                                    | B               | 0,17                 |
|                   | MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                 | 0,20                               | 0,20                                    | Mn              | 0,056                |
|                   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 0,010                              | 0,010                                   | Mo              | 0,0040               |
|                   | ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0,050                              | 0,050                                   | Zn              | 0,011                |
|                   | CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                 | 0,0050                             | 0,0050                                  | Cu              | 0,0013               |
|                   | Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0,010                              | 0,010                                   | Co              | 0,0020               |
| VI                | FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                 | 0,17                               | 0,84                                    | Fe              | 0,17                 |
|                   | Na <sub>2</sub> -EDTA 2H <sub>2</sub> O               | 0,28                               | 1,4                                     | —               | —                    |
| VII               | MOPS (tampon)   | 490                                | 490                                     | —               | —                    |

Pentru pregătirea unui litru de mediu SIS se adaugă următoarele ingrediente la 900 ml de apă deionizată:



**▼M6**

- 10 ml de soluție stoc I
- 5 ml de soluție stoc II
- 5 ml de soluție stoc III
- 5 ml de soluție stoc IV
- 1 ml de soluție stoc V
- 5 ml de soluție stoc VI
- 1 ml de soluție stoc VII (opțional).

*Notă:* O soluție stoc VII suplimentară (tampon MOPS) poate fi necesară pentru anumite substanțe chimice de testare (a se vedea punctul 11).

pH-ul se ajustează la  $6,5 \pm 0,2$  cu 0,1 sau 1 mol de HCl sau NaOH, iar volumul se completează până la un litru cu apă deionizată.

**Mediul de cultură 20X AAP**

Soluțiile stoc se prepară în apă distilată sau deionizată sterilă.

Soluțiile stoc sterile se păstrează la întuneric și temperatură scăzută. În aceste condiții, soluțiile stoc au un termen de valabilitate de cel puțin 6-8 săptămâni.

Pentru mediul 20X-AAP se prepară cinci soluții stoc nutritive (A1, A2, A3, B și C), folosindu-se substanțe chimice cu puritate de reactiv. Pentru prepararea mediului de cultură se adaugă 20 ml din fiecare soluție stoc nutritivă la aproximativ 850 ml de apă deionizată. pH-ul se ajustează la  $7,5 \pm 0,1$  cu 0,1 sau 1 mol de HCl sau NaOH, iar volumul se completează până la un litru cu apă deionizată. Mediul se filtrează apoi într-un recipient steril printr-un filtru cu membrană de (aproximativ) 0,2  $\mu\text{m}$ .

Mediul de cultură destinat testării trebuie preparat cu 1-2 zile înainte de utilizare pentru a permite stabilizarea pH-ului. pH-ul mediului de cultură trebuie verificat înainte de utilizare și reajustat, dacă este necesar, prin adăugarea a 0,1 sau 1 mol de NaOH or HCl conform descrierii de mai sus.

| Soluția stoc nr.: | Substanța  | Concentrația în soluția stoc (g/l) (*) | Concentrația în mediul preparat (mg/l) (*) | Mediul preparat |                         |
|-------------------|--|--|--|-----------------|-------------------------|
|                   |  |  |  | Element         | Concentrație (mg/l) (*) |
| A1                | $\text{NaNO}_3$                                    | 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                 | $\text{H}_3\text{BO}_3$                            | 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                    |

▼ **M6**

| Soluția stoc nr.: | Substanța  | Concentrația în soluția stoc (g/l) (*) | Concentrația în mediul preparat (mg/•l) (*) | Mediul preparat |                          |
|-------------------|--|--|---|-----------------|--------------------------|
|                   |  |  |   | Element         | Concentrație (mg/•l) (*) |
|                   | Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O               | 0,30                                   | 6,0   | —               | —                        |
|                   | ZnCl <sub>2</sub>                                    | 3,3 mg/l                               | 66 μg/l                                     | Zn              | 31 μg/l                  |
|                   | CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 1,4 mg/l                               | 29 μg/l                                     | Co              | 7,1 μg/l                 |
|                   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 7,3 mg/l                               | 145 μg/l                                    | Mo              | 58 μg/l                  |
|                   | CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 0,012 mg/l                             | 0,24 μg/l                                   | Cu              | 0,080 μg/l               |
| C                 | NaHCO <sub>3</sub>                                   | 15                                     | 300   | Na;C            | 220; 43                  |

(\*) În lipsa altor mențiuni

*Notă:* Concentrația finală de bicarbonat adecvată din punct de vedere teoretic (care asigură evitarea ajustărilor semnificative ale pH-ului) este de 15 mg/l, nu de 300 mg/l. Cu toate acestea, utilizarea anterioară a mediului 20X-AAP, inclusiv ring testul pentru prezenta orientare, se bazează pe 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

### Mediul STEINBERG (conform ISO 20079)

Concentrații și soluții stoc

Mediul Steinberg modificat este utilizat în ISO 20079 exclusiv pentru *Lemna minor* (deoarece doar *Lemna minor* este permisă în acest caz), dar testele au arătat că pot fi obținute rezultate bune și în cazul *Lemna gibba*.

Pentru pregătirea mediului se folosesc substanțe chimice cu puritate de reactiv sau de puritate analitică și apă deionizată.

Mediul nutritiv se prepară din soluții stoc sau din mediul cu o concentrație de 10 ori mai mare care permite concentrarea maximă a mediului fără precipitare.

Tabelul 1

### mediu Steinberg cu pH stabilizat (modificat potrivit lui Altenburger)

| Componentă  |                 | Mediu nutritiv |        |
|---|-----------------|----------------|--------|
| Macroelemente   | greutate molară | mg/l           | mmol/l |
| KNO <sub>3</sub>                                      | 101,12          | 350,00         | 3,46   |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O | 236,15          | 295,00         | 1,25   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 136,09          | 90,00          | 0,66   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       | 174,18          | 12,60          | 0,072  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 246,37          | 100,00         | 0,41   |

▼ **M6**

| Componentă   |                 | Mediu nutritiv |        |
|--|-----------------|----------------|--------|
| Macroelemente  | greutate molară | mg/l           | mmol/l |
| Microelemente  | greutate molară | μg/l           | μmol/l |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 61,83           | 120,00         | 1,94   |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 287,43          | 180,00         | 0,63   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 241,92          | 44,00          | 0,18   |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 197,84          | 180,00         | 0,91   |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 270,21          | 760,00         | 2,81   |
| EDTA dihidrat de disodiu                             | 372,24          | 1 500,00       | 4,03   |

Tabelul 2

**Soluții stoc (Macroelemente)**

| 1. Macroelemente (de 50 de ori mai concentrate)       | g/l   |
|---|-------|
| Soluția stoc 1:                                       |       |
| KNO <sub>3</sub>                                      | 17,50 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 4,5   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       | 0,63  |
| Soluția stoc 2:                                       |       |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 5,00  |
| Soluția stoc 3:                                       |       |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O | 14,75 |

Tabelul 3

**Soluții stoc (Microelemente)**

| 2. Microelemente (de 1 000 de ori mai concentrate)   | mg/l     |
|--|----------|
| Soluția stoc 4:                                      |          |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 120,0    |
| Soluția stoc 5:                                      |          |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 180,0    |
| Soluția stoc 6:                                      |          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 44,0     |
| Soluția stoc 7:                                      |          |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 180,0    |
| Soluția stoc 8:                                      |          |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 760,00   |
| EDTA dihidrat de disodiu                             | 1 500,00 |

— Soluțiile stoc 2 și 3, pe de o parte, și 4-7, pe de altă parte, pot fi combinate (respectând concentrațiile prevăzute).

**▼ M6**

- Pentru obținerea unei perioade de valabilitate mai lungi, soluțiile stoc se autoclavează la 121 °C timp de 20 de minute sau, alternativ, se filtrează steril (0,2 μm). Filtrarea sterilă (0,2 μm) este ferm recomandată în cazul soluției stoc 8.

**Prepararea concentrației finale a mediului STEINBERG (modificat)**

- Se adaugă 20 ml de soluții stoc 1, 2 și 3 (a se vedea tabelul 2) la aproximativ 900 ml apă deionizată, pentru a se evita precipitarea.
- Se adaugă 1,0 ml de soluții stoc 4, 5, 6, 7 și 8 (a se vedea tabelul 3).
- pH-ul trebuie să fie de 5,5 +/- 0,2 (se ajustează prin adăugarea unui volum minim de soluție de NaOH sau HCl).
- Se completează cu apă până la 1 000 ml.
- Dacă soluțiile stoc sunt sterilizate și se folosește apă adecvată, nu este necesară sterilizarea suplimentară. Dacă mediul final este sterilizat, soluția stoc 8 se adaugă după autoclavare (la 121 °C, timp de 20 de minute).

**Prepararea mediului STEINBERG (modificat) de 10 ori mai concentrat pentru depozitare intermediară**

- Se adaugă 20 ml de soluții stoc 1, 2 și 3 (a se vedea tabelul 2) la aproximativ 30 ml apă pentru a se evita precipitarea.
- Se adaugă 1,0 ml de soluții stoc 4, 5, 6, 7 și 8 (a se vedea tabelul 3). Se completează cu apă până la 100 ml.
- Dacă soluțiile stoc sunt sterilizate și se folosește apă adecvată, nu este necesară sterilizarea suplimentară. Dacă mediul final este sterilizat, soluția stoc 8 se adaugă după autoclavare (la 121 °C, timp de 20 de minute).
- pH-ul mediului (concentrația finală) trebuie să fie de 5,5 ± 0,2.

## ▼M4

## C.27 TEST DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 218 (2004) a OCDE. Această metodă de testare este concepută pentru evaluarea efectelor expunerii prelungite a substanțelor chimice la larvele de diptere de apă dulce din specia *Chironomus*, care trăiesc în sedimente. Se bazează pe protocoalele de testare a toxicității existente pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus tentans*, care au fost dezvoltate în Europa (1) (2) (3) și America de Nord (4) (5) (6) (7) (8) și testate prin comparare interlaboratoare (1) (6) (9). Se pot utiliza și alte specii de chironomide, despre care există documentație adecvată, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Scenariul de expunere utilizat în această metodă de testare este îmbogățirea sedimentului cu substanța testată. Selectarea scenariului de expunere adecvat depinde de intenția de aplicare a testului. Scenariul de îmbogățire a sedimentului are rolul de a simula niveluri acumulate de substanțe chimice care persistă în sediment. Acest sistem de expunere implică îmbogățirea sedimentului dintr-un sistem de testare tip apă-sediment.
3. De obicei, substanțele care trebuie să fie testate din punct de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă în acest compartiment pe perioade lungi de timp. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse printr-o serie de căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele puternic adsorbante (de exemplu, cu  $\log K_{ow} > 5$ ) sau pentru substanțe cu legături covalente cu sedimentul, ingestia de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate. Pentru a lua în considerare toate căile de expunere potențiale, această metodă de testare se concentrează pe expunerea pe termen lung. Durata de testare este în intervalul 20-29 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 28-65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care este nevoie de date pe termen scurt pentru un anumit scop, de exemplu pentru analiza efectelor unei substanțe chimice instabile, după o perioadă de zece zile se pot înlătura probele duplicat suplimentare.
4. Punctele finale măsurate sunt numărul total de adulți ieșiți din larve și durata până la emergență. Se recomandă ca măsurătorile ratei de supraviețuire și creșterea a larvelor să se facă doar după o perioadă de zece zile, în cazul în care sunt necesare date suplimentare pe termen scurt, folosind probe duplicat suplimentare, după caz.
5. Se recomandă utilizarea de sediment preparat. Sedimentul preparat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:
  - variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea de a găsi surse de sediment necontaminate și curate;
  - testele pot fi inițiate în orice moment, fără să apară fenomenul de variație sezonieră în sedimentul de testare și nu este nevoie ca sedimentul să fie pretrat pentru înlăturarea faunei indigene; de asemenea, utilizarea sedimentului preparat reduce costul asociat cu colectarea pe teren a unor cantități suficiente de sediment, pentru testele de rutină;
  - utilizarea sedimentelor preparate permite compararea toxicității și clasificarea substanțelor în consecință.
6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

## ▼M4

## PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomide în primul stadiu larvar sunt expuse unui interval de concentrații de substanță chimică testată în sistemele apă-sediment. Substanța de testare este îmbogățită în sediment și apoi larvele în primul stadiu sunt introduse în pahare Berzelius în care s-au stabilizat concentrațiile de sediment și apă. La sfârșitul testului se măsoară rata de emergență și dezvoltare a chironomidelor. De asemenea, dacă este necesar se pot măsura și rata de supraviețuire și greutatea larvelor (cu ajutorul unor probe duplicate suplimentare, după caz). Aceste date sunt analizate fie printr-un model de regresie, pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu  $\times$  % a ratei de emergență sau supraviețuire sau creștere a larvelor (de exemplu,  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$  etc.), fie prin testarea ipotezei statistice, pentru a determina CFEO/CMEO. Pentru această ultimă metodă este nevoie de compararea valorilor de efect cu valorile de control, cu ajutorul testelor statistice.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să se cunoască solubilitatea substanței testate în apă, presiunea de vapori, măsurată sau calculată, partiția în sediment și stabilitatea în apă și în sediment. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute. Informații utile includ formula structurală și puritatea substanței testate. Evoluția chimică a substanței testate (de exemplu, disipare, degradare abiotică și biotică etc.) este o altă informație utilă. Îndrumări suplimentare privind substanțele testate cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (12).

## SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic, ca mijloc de asigurare a fiabilității protocolului de testare și a condițiilor de testare. Exemple de substanțe toxice utilizate cu succes în testele de comparare interlaboratoare și în studiile de validare: lindan, trifuralin, pentaclorfenol, clorură de cadmiu și clorură de potasiu (1) (2) (5) (6) (13).

## VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- la sfârșitul testului, emergența în vasele de control trebuie să fie de cel puțin 70 % (1) (6);
- apariția de *C. riparius* și *C. yoshimatsui* la adulți din vasele de control trebuie să aibă loc între 12 și 23 de zile după inserarea în vase; pentru *C. tentans* este nevoie de o perioadă de la 20 până la 65 de zile;
- la sfârșitul testului, în fiecare vas trebuie să se măsoare pH-ul și concentrația de oxigen dizolvat. Concentrația de oxigen trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (VSA) la temperatura utilizată, iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie în intervalul 6-9, în toate vasele de testare;
- temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1,0$  °C. Temperatura apei poate fi controlată printr-o cameră izotermică, iar în acest caz temperatura camerei trebuie să fie confirmată într-un interval de timp corespunzător.

▼ **M4****DESCRIEREA METODEI****Vase de testare**

11. Studiul este efectuat în pahare Berzelius din sticlă de 600 ml, cu diametru de 8 cm. Se pot folosi și alte recipiente, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm<sup>2</sup> pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, teflon).

**Alegerea speciei**

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. Este potrivită și specia *Chironomus tentans*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. Se poate utiliza și *Chironomus yoshimatsui*. Detalii privind metodele de cultură sunt prezentate în apendicele 2, pentru *Chironomus riparius*. Sunt disponibile și informații despre condițiile de cultură pentru alte specii, adică *Chironomus tentans* (4) și *Chironomus yoshimatsui* (11). Identificarea speciei trebuie să se facă înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură internă.

**Sediment**

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment preparat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu chironomidele sau care le-ar putea consuma. De asemenea, se recomandă ca, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. Pentru acest test se recomandă următorul sediment preparat, care are la bază solul artificial utilizat în metoda de testare C.8 (14) (1) (15) (16):

- (a) 4-5 % (greutate uscată) turbă: cu un pH cât mai aproape de 5,5-6,0; este important să se folosească turbă sub formă de pulbere, fin măcinată (dimensiunea particulei de  $\leq 1$  mm) și doar uscată cu aer;
- (b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);
- (c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200  $\mu$ m);
- (d) se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30-50 %;
- (e) se adaugă carbonat de calciu cu calitate chimică pură (CaCO<sub>3</sub>), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la  $7,0 \pm 0,5$ . Conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % ( $\pm 0,5$  %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, caolin și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici etc.). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turbă sau sedimentul este suficient condiționat.

**▼ M4****Apă**

15. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil, așa cum este prezentat în apendicele 2 și 4, este potrivit ca apă pentru testare. Orice apă potrivită, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apa de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare, dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l  $\text{CaCO}_3$ . Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Parametrii de calitate a apei prezentați în apendicele 4 trebuie să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

**Soluții stoc – Sedimente îmbogățite**

16. De obicei, sedimentele îmbogățite, cu o anumită concentrație, sunt preparate prin adăugarea unei soluții de substanță testată direct în sediment. O soluție stoc a substanței testate dizolvate în apa deionizată este amestecată cu sedimentul preparat cu ajutorul unei mori cu valțuri, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. Dacă este puțin solubilă în apă, substanța testată se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform). Această soluție este apoi amestecată cu 10 g de nisip cuarțos fin pentru fiecare vas de testare. Se lasă să se evapore solventul, care trebuie să fie complet eliminat din nisip; apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment pentru fiecare pahar Berzelius. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței testate se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. E necesar să se țină cont de faptul că nisipul provenit din amestecul de substanță testată și nisip trebuie să fie luat în considerare atunci când se prepară sedimentul (adică sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip). Trebuie să se verifice distribuirea completă și uniformă în sediment a substanței testate care se adăugă la sediment. La nevoie, se pot analiza subprobe pentru determinarea gradului de omogenitate.

**PROTOCOLUL TESTULUI**

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de larve pentru fiecare vas. Sunt descrise modelele pentru estimarea punctuală a CE, pentru estimarea CFEO și pentru efectuarea unui test la valori-limită.

**Modelul pentru analiza de regresie**

18. Concentrațiile cu efect (de exemplu  $\text{CE}_{15}$ ,  $\text{CE}_{50}$ ) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie să fie cuprinse în domeniul concentrațiilor incluse în test. În general, precizia și în special validitatea cu care se pot face estimările concentrațiilor de efect ( $\text{CE}_x$ ) sunt mai bune atunci când concentrația de efect se încadrează în limitele concentrațiilor testate. Trebuie să se evite extrapolarea mult sub nivelul celei mai mici concentrații pozitive sau peste nivelul celei mai mari concentrații. Este util să se facă un test preliminar de stabilire a intervalului, pentru a selecta gama de concentrații care vor fi utilizate (a se vedea punctul 27).



▼ **M4**

19. Atunci când se estimează  $CE_x$ , trebuie să se testeze cel puțin cinci concentrații și trei probe duplicate pentru fiecare concentrație. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a dozei are o înclinare mică). Numărul de probe duplicate la fiecare tratare poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. La creșterea numărului de duplicate sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta. Atunci când trebuie să se estimeze rata de supraviețuire și de creștere a larvelor într-un interval de 10 zile, este nevoie de duplicate suplimentare.

**Modelul pentru estimarea CFEO/CMEO**

20. Atunci când urmează să se estimeze CMEO sau CFEO, trebuie să se utilizeze cinci concentrații de testare cu cel puțin patru duplicate, iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de probe duplicate trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $p = 0,05$ ). Pentru rata de dezvoltare, de obicei se recomandă analiza varianței (ANOVA), cum ar fi testul lui Dunnett sau testul lui Williams (17) (18) (19) (20). Pentru rata de urgență, se pot utiliza testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecția Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel.

**Test la valori-limită**

21. Se poate efectua un test la valori-limită (o concentrație de testare și martor) atunci când nu s-au observat efecte în testul preliminar de stabilire a intervalului. Scopul testului la valori-limită este de a efectua un test la o concentrație suficient de mare pentru a permite factorilor de decizie să excludă efectele posibil toxice ale substanței testate, iar limita este stabilită la o concentrație care nu este așteptată să apară în nicio situație. Se recomandă 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicate atât pentru loturile tratate, cât și pentru cele martor. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de lotul martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $p = 0,05$ ). Cu răspuns metric (rată de dezvoltare și greutate), testul  $t$  este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, varianțe omogene). În cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe, se pot utiliza testul  $t$  pentru varianțe inegale sau un test nonparametric, cum ar fi testul Wilcoxon-Mann-Whitney. Pentru rata de urgență este adecvat testul exact al lui Fisher.

**PROCEDURĂ****Condiții de expunere***Prepararea sistemului apă-sediment îmbogățit*

22. Procedura de îmbogățire descrisă în metoda de testare C.8: Toxicitatea la râme este recomandată pentru aplicarea substanței testate (14). Sedimentele îmbogățite sunt puse în vase și se adaugă apă acoperitoare, pentru a ajunge la un raport de volum sediment-apă de 1:4 (a se vedea punctele 11 și 15). Adâncimea stratului de sediment trebuie să fie între 1,5 și 3 cm. Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și repunerea în suspensie a materiei fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive.
23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). La nevoie, în timpul studiului se completează apa până la volumul inițial, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să fie făcută cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri.

## ▼ M4

*Stabilizare*

24. După adăugarea de apă acoperitoare la sedimentul îmbogățit, este de preferat să se lase timp pentru separarea substanței testate din faza apoasă și trecerea ei în sediment (3) (4) (6) (13). De preferință, această operațiune trebuie să se facă în aceleași condiții de temperatură și aerare ca și cele utilizate în test. Perioada de timp corespunzătoare pentru echilibrare depinde de sediment și de substanța chimică și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4-5 săptămâni). Întrucât în această perioadă se poate produce degradarea multor substanțe chimice, nu se așteaptă atingerea echilibrului, dar se recomandă să se lase o perioadă de echilibrare de 48 de ore. La sfârșitul acestei perioade de echilibrare ulterioară, concentrația substanței testate trebuie să fie măsurată în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, cel puțin la concentrația cea mai mare și la una mai scăzută (a se vedea punctul 38). Aceste determinări analitice ale substanței testate permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor măsurate.

*Adăugarea de organisme de testare*

25. Cu patru până la cinci zile înainte de adăugarea organismelor de testare în vasele de testare, pontele trebuie să fie prelevate din culturi și plasate în vase mici, în mediu de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură vechi, provenit din cultura-mamă, sau un mediu proaspăt preparat. În cazul în care se recurge la a doua metodă, la mediul de cultură trebuie să se adauge o cantitate mică de hrană, de exemplu alge verzi și/sau câteva picături de filtrat de la o suspensie de hrană pentru pești fin măcinată (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar ponte proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze la câteva zile după ce sunt depuse ouăle (2 până la 3 zile pentru *Chironomus riparius* la 20 °C și 1 până la 4 zile pentru *Chironomus tentans* la 23 °C și *Chironomus yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvară are loc în patru stadii, fiecare cu o durată de 4-8 zile. În studiu trebuie să se utilizeze larve din primul stadiu (2-3 sau 1-4 zile după eclozare). Stadiul musculițelor poate fi verificat prin măsurarea lățimii capsulei cefalice (6).
26. Câte douăzeci de larve în primul stadiu sunt repartizate arbitrar la fiecare vas de testare care conține sediment îmbogățit și apă, cu ajutorul unei pipete cu vârf țesit. În timpul adăugării larvelor în vasele de testare trebuie să se oprească aerarea apei și ea trebuie să rămână oprită pentru încă 24 de ore după adăugarea larvelor (a se vedea punctele 25 și 32). Conform protocolului de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve utilizate în funcție de concentrație este 60 pentru estimarea punctuală a CE și 80 pentru determinarea CFEO.

*Concentrațiile de testare*

27. Poate fi util un test de stabilire a intervalului, pentru a determina gama de concentrații pentru testul definitiv. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații de substanță testată, distribuite la intervale largi. Pentru a obține aceeași densitate de suprafață pentru chironomide, care va fi utilizată pentru testul definitiv, chironomidele sunt expuse la fiecare concentrație a substanței testate pentru o perioadă care permite estimarea unor concentrații de testare adecvate și nu este nevoie de duplicate.
28. Concentrațiile de testare pentru testul definitiv sunt decise pe baza rezultatului obținut în testul de stabilire a intervalului. Trebuie să se utilizeze cel puțin cinci concentrații, care să fie alese după metoda descrisă la punctele 18-20.

▼ **M4***Martori*

29. În test trebuie să se includă vase cu probe-martor, care să nu conțină nicio substanță testată, dar în care să se afle sediment, cu un număr corespunzător de duplicate (a se vedea punctele 19-20). În cazul în care pentru aplicarea substanței testate s-a utilizat un solvent (a se vedea punctul 16), trebuie să se adauge un martor de solvent pentru sediment.

*Sistem de testare*

30. Sunt utilizate sisteme statice. Sistemele semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi folosite în cazuri excepționale, de exemplu în cazul în care specificațiile privind calitatea apei devin inadecvate pentru organismul testat sau afectează echilibrul chimic (de exemplu, nivelurile de oxigen dizolvat scad prea mult, concentrația de produse excretoare crește prea mult sau mineralele se dizolvă din sediment și afectează pH-ul și/sau duritatea apei). Totuși, în mod normal, alte metode de ameliorare a calității apei acoperitoare, cum ar fi aerarea, vor fi suficiente și de preferat.

*Hrană*

31. Larvele trebuie să fie hrănite, de preferință zilnic sau cel puțin de trei ori pe săptămână. Hrana pentru pești (o suspensie în apă sau hrană măcinată fin, de exemplu TetraMin sau TetraPhyll; a se vedea detalii în apendicele 2), o cantitate de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) pentru fiecare larvă, zilnic, pare a fi potrivită pentru larvele tinere în primele 10 zile. Pentru larvele mai mature poate fi necesară o cantitate de hrană ceva mai mare: o cantitate de 0,5-1 mg pentru fiecare larvă, zilnic, ar trebui să fie suficientă pentru restul testului. Rația de hrană trebuie să fie redusă în toate loturile tratate și în loturile martor, în cazul în care se observă creșteri fungică sau atunci când se constată mortalitate în loturile martor. Atunci când nu se poate opri proliferarea fungică, testul trebuie să fie repetat. La testarea unor substanțe cu capacitate mare de adsorbție (de exemplu, cu  $\log K_{ow} > 5$ ) sau a unor substanțe cu legătură covalentă cu sedimentul, cantitatea de hrană necesară pentru asigurarea supraviețuirii și creșterii naturale a organismelor poate fi adăugată la sedimentul preparat înainte de perioada de stabilizare. Pentru aceasta, trebuie să se utilizeze material vegetal în loc de hrană pentru pești, de exemplu se poate adăuga o cantitate de 0,5 % (greutate uscată) frunze măcinate mărunț de urzică (*Urtica dioica*), de dud (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de alt material vegetal (*Cerophyl* sau celuloză alfa).

*Condiții de incubare*

32. Aerarea ușoară a apei acoperitoare în vasele de testare se face, de preferință, cu 24 de ore înainte de adăugarea larvelor și este urmărită pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenție concentrației de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din VSA). Aerarea se face printr-o pipetă Pasteur din sticlă, fixată la 2-3 cm deasupra stratului de sediment (una sau câteva bule de aer pe secundă). La testarea substanțelor chimice volatile, e bine să se aibă grijă să nu se aereze sistemul apă-sediment.
33. Testul se face la o temperatură constantă de 20 °C ( $\pm 2$  °C). Pentru *C. tentans* și *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C și respectiv 25 °C ( $\pm 2$  °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar nivelul de iluminare trebuie să fie de 500-1 000 de lux.

**▼ M4***Durata de expunere*

34. Expunerea începe cu adăugarea de larve la vasele cu probe îmbogățite și la cele cu probe-martor. Durata maximă de expunere este de 28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care musculițele ies mai devreme, testul poate fi încheiat după cel puțin cinci zile de la emergența ultimului adult din lotul-martor.

**Observații***Emergență*

35. Se determină perioada de dezvoltare și numărul total de musculițe masculi și femele deplin ieșite din stadiul de larvă. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.
36. Vasele de testare trebuie să fie controlate cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a evalua vizual orice comportament anormal (de exemplu, părăsirea sedimentului, un mod neobișnuit de a înota), prin comparație cu lotul martor. În perioada de emergență probabilă este nevoie să se numere zilnic musculițele ieșite din stadiul de larvă. Zilnic se înregistrează sexul și numărul musculițelor ieșite complet din stadiul de larvă. După identificare, musculițele sunt scoase din vase. Orice ponte depuse înainte de terminarea testului trebuie să fie înregistrate și apoi înlăturate, pentru a preveni reintroducerea larvelor în sediment. De asemenea, se înregistrează numărul de pupe vizibile la care nu s-a produs emergența. În apendicele 5 se dau orientări privind măsurarea emergenței.

*Creștere și supraviețuire*

37. În cazul în care este nevoie de datele pe 10 zile privind supraviețuirea și creșterea larvelor, trebuie să se prevadă de la început vase de testare suplimentare, pentru a putea fi utilizate ulterior. Sedimentul din aceste vase suplimentare este cernut printr-o sită de 250 μm, pentru reținerea larvelor. Simptomele care indică moartea larvelor sunt imobilitatea sau lipsa de reacție la stimuli mecanici. Larvele care nu sunt recuperate trebuie să fie numărate tot ca larve moarte (există posibilitatea ca larvele care au murit la începutul testului să fi fost degradate de microbi). Se determină greutatea uscată (fără resturi de la larvele moarte) a larvelor supraviețuitoare din fiecare vas de testare, apoi se calculează greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas. Este util să se determine în ce stadiu de dezvoltare se află larvele supraviețuitoare; pentru aceasta, se poate măsura lățimea capsulei cefalice a fiecărui individ.

**Măsurători analitice***Concentrația substanței testate*

38. Înainte de începerea testului (adică adăugarea de larve), probe de sediment compact sunt înlăturate din cel puțin un vas pentru fiecare lot tratat, în vederea determinării analitice a concentrației substanței testate în sediment. Se recomandă, ca cerința minimă, ca probe din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment să fie analizate la începutul testului (a se vedea punctul 24) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai scăzută. Aceste determinări ale concentrației substanței testate furnizează informații despre comportamentul/separarea substanței testate în sistemul apă-sediment.
39. Atunci când se fac măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a șaptea) și când pentru analiză este nevoie de probe mari, care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe probe din vase de testare suplimentare, tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.

▼ **M4**

40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C, timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța testată nu adsorbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

*Parametri fizico-chimici*

41. Trebuie să se măsoare în mod corespunzător pH-ul și temperatura din vasele de testare (a se vedea punctul 10). Duritatea și conținutul de amoniac trebuie să fie măsurate în loturile martor și într-un vas de testare, la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

## DATE ȘI RAPORT

*Interpretarea rezultatelor*

42. Scopul acestui test este să se determine efectul unei substanțe testate asupra ratei de dezvoltare și asupra numărului total de musculițe masculi și femele ieșite complet din stadiul de larvă sau, în cazul testului de 10 zile, efectele asupra supraviețuirii și greutateii larvelor. În cazul în care nu există indicii de sensibilități diferite, din punct de vedere statistic, rezultatele obținute de la masculi și de la femele pot fi grupate, în scop statistic. Diferențele de sensibilitate între sexe pot fi interpretate statistic, de exemplu cu ajutorul unui test tabelar  $\chi^2$ -r  $\times$  2. După zece zile trebuie să se determine rata de supraviețuire a larvelor și greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas, unde este cazul.
43. Concentrațiile de efect, exprimate și bazate pe greutatea uscată, sunt calculate, de preferință, pe baza concentrațiilor în sediment măsurate la începutul testului (a se vedea punctul 38).
44. Pentru a calcula o estimare punctuală pentru  $CE_{50}$  sau orice altă  $CE_x$ , se pot utiliza statisticile pentru fiecare vas, ca duplicate adevărate. La calcularea intervalului de încredere pentru orice  $CE_x$ , trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de redusă încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la statistica pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității varianței. Totuși, valorile  $CE_x$  trebuie să fie calculate după ce răspunsul revine la valoarea originală.
45. Atunci când analiza statistică are ca scop determinarea CFEO/CMEO prin testarea ipotezei statistice, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, de exemplu printr-o analiză a varianței cu mai multe criterii de clasificare. Alternativ, mai multe teste robuste (21) pot fi adecvate în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite.

*Rată de urgență*

46. Ratele de urgență sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton și când aceste date corespund așteptărilor. În caz contrar, se pot utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haenszel, cu valori p ajustate Bonferroni-Holm. Dacă există dovezi că variabilitatea între probe duplicat este mai mare, la aceeași concentrație, decât cea indicată de o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în (21).

▼ **M4**

Se determină suma musculițelor ieșite în fiecare vas,  $n_e$ , care se împarte la numărul de larve introduse,  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

unde:

ER = rata de urgență

$n_e$  = numărul de musculițe ieșite în fiecare vas

$n_a$  = numărul de larve introduse în fiecare vas

47. O alternativă mai potrivită pentru eșantioane de dimensiuni mari, atunci când există varianță extra-binomială, este tratarea ratei de urgență ca o reacție continuă și utilizarea unor proceduri, cum ar fi testul lui William, atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton, care corespunde cu aceste date ER. Testul lui Dunnett este potrivit în cazurile în care nu există monotonie. O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind un număr mai mare de cinci musculițe ieșite și cinci musculițe neieșite, pentru fiecare probă duplicat (vas).
48. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile ER trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea trigonometrică sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza varianțele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea trigonometrică este aplicată prin preluarea arcsinusului ( $\sin^{-1}$ ) rădăcinii pătrate a ER.
49. Pentru rate de urgență, valorile  $CE_x$  sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [sau, de exemplu, probit (22), logit, Weibull, un program informatic comercial corespunzător etc.]. În cazul în care analiza de regresie nu are succes (de exemplu, atunci când există mai puțin de două reacții parțiale), se utilizează alte metode nonparametrice, cum ar fi media mobilă sau interpolarea simplă.

#### *Rată de dezvoltare*

50. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și urgența cohorții experimentale de musculițe. (Pentru calculul duratei reale de dezvoltare, trebuie să se ia în considerare vârsta larvelor la momentul introducerii). Rata de dezvoltare este inversul duratei de dezvoltare (unitate:  $1/zi$ ) și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate a sedimentelor, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, procedurile de testare parametrică puternice se pot utiliza mai curând pentru rata de dezvoltare, decât pentru durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca reacție continuă, valorile  $CE_x$  pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu, (23), (24)].
51. Pentru testele statistice următoare, se presupune că numărul de musculițe observate la inspecția din ziua  $x$  au ieșit la jumătatea intervalului de timp dintre ziua  $x$  și ziua  $x - 1$  ( $l$  = lungimea intervalului de inspecție, de obicei o zi). Rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas ( $\bar{x}$ ) este calculată cu formula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

**▼ M4**

unde:

$\bar{x}$ : rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas

$i$ : indicele intervalului de inspecție

$m$ : numărul maxim de intervale de inspecție

$f_i$ : numărul de musculițe ieșite în intervalul de inspecție  $i$

$n_e$ : numărul total de musculițe ieșite la sfârșitul experimentului ( $= \sum f_i$ )

$x_i$ : rata de dezvoltare a musculițelor ieșite în intervalul  $i$

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

unde:

$\text{ziua}_i$ : ziua inspecției (zile de la aplicare)

$l_i$ : lungimea intervalului de inspecție  $i$  (zile, de obicei 1 zi)

**Raport de testare**

52. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

*Substanța de testat:*

- natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];
- datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate.

*Speciile folosite pentru testare:*

- animalele de testare utilizate: specie, denumire științifică, sursa organismelor și condițiile de reproducere;
- informații privind manipularea pontelor și a larvelor;
- vârsta animalelor testate la inserarea în vasele de testare.

*Condițiile de testare:*

- sedimentul folosit, adică sediment natural sau preparat;
- pentru sedimentul natural, localizarea și descrierea locului de prelevare a probelor, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristici: pH, conținut de carbon organic, raport C/N și granulometrie (dacă este cazul);
- prepararea sedimentului: ingrediente și caracteristici (conținut de carbon organic, pH, umiditate etc. la începutul testului);
- pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate etc. la începutul testului);
- adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;
- volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului ud cu și fără apă interstițială;

**▼M4**

- vasele de testare (material și dimensiune);
- metoda de îmbogățire a sedimentului: concentrații de testare utilizate, număr de probe duplicat și utilizarea solventului, dacă este cazul;
- faza de stabilizare de echilibru a sistemului apă-sediment îmbogățit: durată și condiții;
- condițiile de incubare: temperatură, ciclu de lumină și nivel de iluminare, aerare (frecvență și intensitate);
- informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

*Rezultatele:*

- valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasul de testare;
- calitatea apei în vasele de testare, adică pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și conținutul de amoniac;
- înlocuirea apei de testare evaporate, dacă este cazul;
- numărul de musculițe masculi și femele ieșite în fiecare vas și în fiecare zi;
- numărul de larve care nu s-au transformat în musculițe, în fiecare vas;
- greutatea medie individuală a larvelor în fiecare vas și pentru fiecare stadiu larvar, dacă este cazul;
- procentul de emergență pe fiecare probă duplicat și concentrația de testare (musculițe masculi și femele, împreună);
- rata medie de dezvoltare a musculițelor complet ieșite din stadiul de larvă pe fiecare probă duplicat și rata de tratare (musculițe masculi și femele împreună);
- estimări ale efectelor toxice, de exemplu CEx (și intervalele de încredere asociate), CFEO și/sau CMEO și metode statistice utilizate pentru determinarea lor;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.
- (3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. În ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.



## ▼M4

- (6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J. și Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Metoda de testare C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.
- (15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.
- (19) 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.
- (20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, Toxicol. Sci. 66: 298-312.

**▼ M4***Apendicele 1***DEFINIȚII**

În cadrul acestei metode de testare se folosesc următoarele definiții și prescurtări:

**Sedimentul preparat** sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic: un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

**Apa acoperitoare:** apa plasată peste sediment în vasul de testare.

**Apa interstițială:** apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

**Sedimentul îmbogățit:** sedimentul la care se adaugă substanța testată.

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼ **M4***Apendicele 2***Recomandări pentru cultura de *Chironomus riparius***

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip cuarțos într-un strat subțire, de circa 5-10 mm grosime. Un substrat adecvat s-a dovedit a fi și kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm. Apoi se adaugă apa corespunzătoare, la o adâncime de câțiva cm. Nivelurile de apă trebuie să fie completate la nevoie, pentru a compensa pierderea prin evaporare și pentru a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cutie adecvată, pentru a nu permite ca adulții emergenți să scape. Cutia trebuie să fie suficient de mare pentru a permite mișcarea în voie a adulților emergenți, altfel este posibil să nu apară populația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).
2. Cutiile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la  $20 \pm 2$  °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (la un nivel de iluminare de circa 1 000 de lux), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

**Apa de diluție**

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit, se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă tuburile de larve.

**Hrănirea larvelor**

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă patentată similară de hrană pentru pești) la aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi administrată sub formă de pulbere măcinată uscată sau ca suspensie în apă: o cantitate de 1,0 g de hrană sub formă de fulgi se adaugă la 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat la o rată de circa 5 ml pentru fiecare vas și fiecare zi (a se agita înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai mare pot primi mai mult.
5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „neclar”, trebuie să se micșoreze cantitatea de hrană. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină hrană va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.
6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

**Hrănirea adulților ieșiți din larve**

7. Unele experimente au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții ieșiți din larve un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.

**▼ M4****Emergență**

8. La  $20 \pm 2$  °C, adulții vor începe să iasă din vasele de creștere a larvelor după aproximativ 13-15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

**Ponte**

9. După ce adulții sunt prezenți în cutia de creștere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de ponte gelatinoase. Dacă aceasta apare, ponte trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține o probă din apa în care au crescut. Ponte sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2-4 ponte/vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.

10. Larvele în primul stadiu ar trebui să eclozeze după 2-3 zile.

**Pregătirea de noi vase de cultură**

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce musculițele adulte au ieșit din larve. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de manipulare.

**Prepararea soluțiilor de testare „M4” și „M7”**

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este preparat la fel ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1, pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai scăzute în „M7” față de „M4”. Este în pregătire o publicație privind mediul „M7” (Elendt, comunicare personală). Soluția de testare nu trebuie să fie preparată conform indicațiilor lui Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de  $\text{NaSiO}_3$ ,  $5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  și  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  indicate pentru prepararea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

**Prepararea mediului „M7”**

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). 50 de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 sunt adăugate la un litru de apă deionizată, pentru a prepara mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. (Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote). Mediul este aerat și stabilizat.

**BIBLIOGRAFIE:**

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

▼ **M4**

Tabelul 1

**Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7**

| Soluții stoc (I)  | Cantitate (mg) adăugată la un litru de apă deionizată | Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un litru de apă deionizată |      | Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l) |         |
|---|---|---|------|--|---------|
|   |   | M4  | M7   | M4   | M7      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>                           | 57 190  | 1,0   | 0,25 | 2,86   | 0,715   |
| MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 7 210   | 1,0   | 0,25 | 0,361  | 0,090   |
| LiCl <sup>(1)</sup>   | 6 120   | 1,0   | 0,25 | 0,306  | 0,077   |
| RbCl <sup>(1)</sup>   | 1 420   | 1,0   | 0,25 | 0,071  | 0,018   |
| SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 3 040   | 1,0   | 0,25 | 0,152  | 0,038   |
| NaBr <sup>(1)</sup>   | 320   | 1,0   | 0,25 | 0,016  | 0,004   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>    | 1 260   | 1,0   | 0,25 | 0,063  | 0,016   |
| CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 335   | 1,0   | 0,25 | 0,017  | 0,004   |
| ZnCl <sub>2</sub>   | 260   | 1,0   | 1,0  | 0,013  | 0,013   |
| CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                                  | 200   | 1,0   | 1,0  | 0,010  | 0,010   |
| KI  | 65  | 1,0   | 1,0  | 0,0033   | 0,0033  |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>  | 43,8  | 1,0   | 1,0  | 0,0022   | 0,0022  |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>   | 11,5  | 1,0   | 1,0  | 0,00058  | 0,00058 |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> | 5 000   | 20,0  | 5,0  | 2,5  | 0,625   |
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>    | 1 991   | 20,0  | 5,0  | 1,0  | 0,249   |

<sup>(1)</sup> Aceste substanțe diferă în M4 și M7, așa cum s-a indicat mai sus.

<sup>(2)</sup> Aceste soluții sunt preparate individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavizate imediat.

Tabelul 2

**Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7**

|   | Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg) | Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 293 800   | 1,0   | 293,8   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O  | 246 600   | 0,5   | 123,3   |
| KCl                                     | 58 000  | 0,1   | 5,8   |
| NaHCO <sub>3</sub>                      | 64 800  | 1,0   | 64,8  |
| NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O | 50 000  | 0,2   | 10,0  |
| NaNO <sub>3</sub>                       | 2 740   | 0,1   | 0,274   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 1 430   | 0,1   | 0,143   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>         | 1 840   | 0,1   | 0,184   |

▼ **M4**

Tabelul 3

**Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7. Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a obține o singură soluție stoc de vitamine**

|                       | Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg) | Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|-----------------------|---|---|---|
| Clorhidrat de tiamină | 750   | 0,1   | 0,075   |
| Ciancobalamină (B12)  | 10  | 0,1   | 0,0010  |
| Biotină               | 7,5   | 0,1   | 0,00075   |

*BIBLIOGRAFIE:*

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Apendicele 3***PREPARAREA SEDIMENTULUI****Compoziția sedimentului**

Compoziția sedimentului preparat trebuie să fie următoarea:

| Constituent        | Caracteristici   | % de sediment greutate uscată |
|--------------------|--|-------------------------------|
| Turbă              | Mușchi de turbă ( <i>Sphagnum</i> ), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5-6,0, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor $\leq 1$ mm) și uscat cu aer | 4-5                           |
| Nisip cuarțos      | Granulație: $> 50$ % din particule trebuie să fie în intervalul 50-200 $\mu\text{m}$   | 75-76                         |
| Argilă caolinitică | Conținut de caolinit $\geq 30$ %   | 20                            |
| Carbon organic     | Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip   | 2 ( $\pm 0,5$ )               |
| Carbonat de calciu | $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, pur din punct de vedere chimic   | 0,05-0,1                      |
| Apă                | Conductivitate $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$  | 30-50                         |

**Preparare**

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la  $5,5 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ . Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la  $20 \pm 2$  °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie între  $6,0 \pm 0,5$ . Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolin) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în gama de 30-50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, se recomandă ca sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

**Depozitare**

Constituenții uscați pentru prepararea sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în cadrul testului. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea.

**BIBLIOGRAFIE:**

Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼ **M4***Apendicele 4***Caracteristici chimice acceptabile ale apei de diluție**

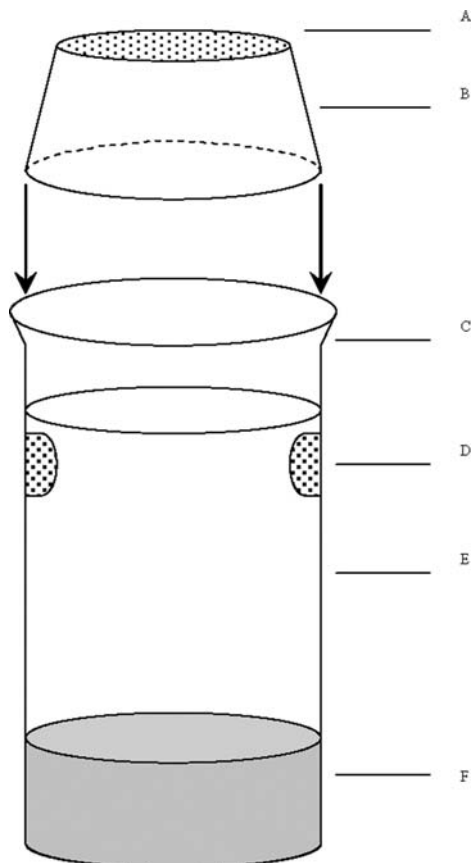
| Substanță   | Concentrații   |
|---|----------------|
| Particule în suspensie                                    | < 20 mg/l      |
| Carbon organic total                                      | < 2 mg/l       |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l       |
| Duritate ca CaCO <sub>3</sub>                             | < 400 mg/l (*) |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l      |
| Total pesticide organofosforice                           | < 50 ng/l      |
| Total pesticide organofosforice plus bifenil policlorurat | < 50 ng/l      |
| Total clor organic  | < 25 ng/l      |

(\*) Totuși, trebuie notat faptul că în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ioni care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).



▼ **M4***Apendicele 5***Orientări pentru monitorizarea emergenței larvelor de chironomide**

Pe paharele Berzelius de testare sunt plasate capcane de emergență. Aceste capcane sunt necesare începând din a douăzecea zi până la sfârșitul testului. În figura de mai jos se prezintă un exemplu de capcană utilizată:



A: sită de nailon

D: orificii cu sită, pentru schimbul de apă

B: cupe de plastic răsturnate

E: apă

C: pahar Berzelius fără muchie, pentru expunere

F: sediment

## ▼M4

## C. 28. TESTUL DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU APĂ ÎMBOGĂȚITĂ

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 219 (2004) a OCDE. Această metodă de testare este concepută pentru evaluarea efectelor expunerii prelungite a substanțelor chimice la larvele de diptere de apă dulce din specia *Chironomus*, care trăiesc în sedimente. Ea se bazează în principal pe orientările BBA, folosind un sistem de testare apă-sediment cu sol artificial și un scenariu de expunere cu coloană de apă (1). De asemenea, ține cont de protocoalele de testare a toxicității existente pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus tentans*, care au fost dezvoltate în Europa și America de Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) și testate prin comparare interlaboratoare (1) (6) (9). Se pot utiliza și alte specii de chironomide, despre care există documentație adecvată, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Scenariul de expunere utilizat în această metodă de testare este îmbogățirea apei. Selectarea scenariului de expunere adecvat depinde de aplicarea intenționată a testului. Scenariul de expunere pentru apă, care implică îmbogățirea coloanei de apă, este menit să simuleze o pulverizare cu pesticide și acoperă valoarea maximă inițială a concentrațiilor în apa interstițială. De asemenea, este util pentru alte tipuri de expunere (inclusiv scurgerile chimice), cu excepția proceselor de acumulare care durează mai mult decât perioada de testare.
3. De obicei, substanțele care trebuie să fie testate din punct de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă în acest compartiment pe perioade lungi de timp. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse printr-o serie de căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele puternic adsorbante (de exemplu, cu  $\log K_{ow} > 5$ ) sau pentru substanțe cu legături covalente cu sedimentul, ingestia de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate. Pentru a lua în considerare toate căile de expunere potențiale, această metodă de testare se concentrează pe expunerea pe termen lung. Durata de testare este în intervalul de 20-28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 28-65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care este nevoie de date pe termen scurt pentru un anumit scop, de exemplu pentru analiza efectelor unei substanțe chimice instabile, după o perioadă de zece zile se pot înlătura probele duplicat suplimentare.
4. Punctele finale măsurate sunt numărul total de adulți ieșiți și durata până la emergență. Se recomandă ca măsurătorile ratei de supraviețuire și creștere a larvelor să se facă doar după o perioadă de zece zile, în cazul în care sunt necesare date suplimentare pe termen scurt, folosind probe duplicat suplimentare, după caz.
5. Se recomandă utilizarea de sediment preparat. Sedimentul preparat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:
  - variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea de a găsi surse de sediment necontaminate și curate;
  - testele pot fi inițiate în orice moment, fără să apară fenomenul de variație sezonieră în sedimentul de testare și nu este nevoie ca sedimentul să fie pretrat pentru înlăturarea faunei indigene; de asemenea, utilizarea sedimentului preparat reduce costul asociat cu colectarea pe teren a unor cantități suficiente de sediment, pentru testele de rutină;

## ▼M4

- utilizarea de sediment preparat permite comparații de toxicitate și clasificarea substanțelor în consecință: datele de toxicitate din teste cu sedimente naturale și artificiale au fost comparabile pentru mai multe substanțe chimice (2).
6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

## PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomidele în primul stadiu larvar sunt expuse la o gamă de concentrații de substanță chimică testată în sistemele apă-sediment. Testul începe prin plasarea larvelor în primul stadiu în paharele Berzelius de testare care conțin sistemul apă-sediment, urmată de îmbogățirea substanței testate în apă. La sfârșitul testului se măsoară rata de emergență și dezvoltare a chironomidelor. Dacă este necesar se pot măsura, după 10 zile, și rata de supraviețuire și greutatea larvelor (cu ajutorul unor probe duplicat suplimentare, după caz). Aceste date sunt analizate fie printr-un model de regresie, pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu  $\times$  % a ratei de emergență, supraviețuire sau creștere a larvelor (de exemplu,  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$  etc.), fie prin testarea ipotezei statistice, pentru a determina CFEO/CME0. Pentru această ultimă metodă este nevoie de compararea valorilor de efect cu valorile de control, cu ajutorul testelor statistice.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să se cunoască solubilitatea substanței testate în apă, presiunea de vapori, măsurată sau calculată, partiția în sediment și stabilitatea în apă și în sediment. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute. Informații utile includ formula structurală și puritatea substanței testate. Evoluția chimică a substanței testate (de exemplu, disipare, degradare abiotică și biotică etc.) este o altă informație utilă. Îndrumări suplimentare privind substanțele de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (12).

## SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic, ca mijloc de asigurare a fiabilității protocolului de testare și a condițiilor de testare. Exemple de substanțe toxice utilizate cu succes în testele de comparare interlaboratoare și în studiile de validare sunt: lindan, trifuralin, pentaclorfenol, clorura de cadmiu și clorura de potasiu. (1) (2) (5) (6) (13).

## VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- la sfârșitul testului, emergența în vasele cu loturi martor trebuie să fie de cel puțin 70 % (1) (6);
- emergența *C. riparius* și *C. yoshimatsui* din larve în adulți din vasele cu loturi martor trebuie să aibă loc între 12 și 23 de zile după inserarea în vase; pentru *C. tentans* este nevoie de o perioadă de la 20 până la 65 de zile;
- la sfârșitul testului, în fiecare vas trebuie să se măsoare pH-ul și concentrația de oxigen dizolvat. Concentrația de oxigen trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (VSA) la temperatura utilizată, iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie în intervalul 6-9, în toate vasele de testare;

▼ **M4**

- temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1,0$  °C. Temperatura apei poate fi controlată printr-o cameră izotermică, iar în acest caz temperatura camerei trebuie să fie confirmată într-un interval de timp corespunzător.

**DESCRIEREA METODEI****Vase de testare**

11. Studiul este efectuat în pahare Berzelius din sticlă de 600 ml, cu diametru de 8 cm. Se pot folosi și alte recipiente, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm<sup>2</sup> pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, teflon).

**Alegerea speciei**

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. Este potrivită și specia *Chironomus tentans*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. Se poate utiliza și *Chironomus yoshimatsui*. Detalii privind metodele de cultură sunt date în apendicele 2, pentru *Chironomus riparius*. Sunt disponibile și informații despre condițiile de cultură pentru alte specii, adică *Chironomus tentans* (4) și *Chironomus yoshimatsui* (11). Identificarea speciei trebuie să se facă înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură internă.

**Sediment**

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment preparat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu chironomidele sau care le-ar putea consuma. De asemenea, se recomandă ca, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. Pentru acest test se recomandă următorul sediment preparat, care are la bază solul artificial utilizat în metoda de testare C.8 (14) (1) (15) (16):

- (a) 4-5 % (greutate uscată) turbă: cu un pH cât mai aproape de 5,5-6,0 %; este important să se folosească turbă sub formă de pulbere, fin măcinată (dimensiunea particulei de  $\leq 1$  mm) și doar uscată cu aer;
- (b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);
- (c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predomină nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200  $\mu$ m);
- (d) se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30-50 %;
- (e) se adaugă carbonat de calciu cu calitate chimică pură (CaCO<sub>3</sub>), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la  $7,0 \pm 0,5$ ;
- (f) conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % ( $\pm 0,5$  %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

▼ **M4**

14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, argilă caolin și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici etc.). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul este suficient condiționat.

**Apă**

15. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil, așa cum este prezentat în apendicele 2 și 4, este potrivit ca apă pentru testare. Orice apă potrivită, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apa de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare, dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l  $\text{CaCO}_3$ . Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Parametrii de calitate a apei prezentați în apendicele 4 trebuie să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

**Soluții stoc – Apă îmbogățită**

16. Concentrațiile de testare se calculează pe baza concentrațiilor din coloana de apă, adică apa care acoperă sedimentul. Soluțiile testate, în concentrațiile alese, se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin dizolvarea substanței testate în mediul experimental. În unele cazuri, poate fi necesară folosirea solvenților sau a agenților de dispersie pentru a realiza o soluție stoc corespunzătoare, cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți potriviți sunt acetona, etanolul, metanolul, eterul monometilic de etilen glicol, eterul dimetilic de etilen glicol, dimetilformamida și trietilen glicolul. Agenții de dispersie care pot fi utilizați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația de agent de solubilizare în mediul de testare final trebuie să fie minimă (adică  $\leq 0,1$  ml/l) și să fie aceeași în toate loturile tratate. Când se folosește agent de solubilizare, acesta trebuie să nu provoace efecte semnificative asupra supraviețuirii sau efecte adverse vizibile asupra larvelor de chironomide, în testul pe un lot martor tratat numai cu solvent. Totuși, se va face tot posibilul să se evite folosirea unor astfel de materiale.

**PROTOCOLUL TESTULUI**

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de larve pe fiecare vas. Sunt descrise modelele pentru estimarea punctuală a CE, pentru estimarea CFEO și pentru efectuarea unui test la valori-limită. Analiza de regresie este preferabilă față de testarea ipotezei statistice.

**Modelul pentru analiza de regresie**

18. Concentrațiile cu efect (de exemplu  $\text{CE}_{15}$ ,  $\text{CE}_{50}$ ) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie să fie cuprinse în domeniul concentrațiilor incluse în test. În general, precizia și în special validitatea cu care se pot face estimările concentrațiilor de efect ( $\text{CE}_x$ ) sunt mai bune atunci când concentrația de efect se încadrează în limitele concentrațiilor testate. Trebuie să se evite extrapolarea mult sub nivelul celei mai

▼ **M4**

mici concentrații pozitive sau peste nivelul celei mai mari concentrații. Este util să se facă un test preliminar de stabilire a intervalului, pentru a selecta intervalul de concentrații care vor fi utilizate (a se vedea punctul 27).

19. Atunci când se estimează  $CE_x$ , trebuie să se testeze cel puțin cinci concentrații și trei probe duplicate pentru fiecare concentrație. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a dozei are o înclinare mică). Numărul de duplicate la fiecare tratare poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. La creșterea numărului de duplicate sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta. Atunci când trebuie să se estimeze rata de supraviețuire și de creștere a larvelor într-un interval de 10 zile, este nevoie de duplicate suplimentare.

*Modelul pentru estimarea CFEO/CME0*

20. Atunci când urmează să se estimeze CME0 sau CFEO, trebuie să se utilizeze cinci concentrații de testare cu cel puțin patru probe duplicate, iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de probe duplicate trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $p = 0,05$ ). Pentru rata de dezvoltare, de obicei se recomandă analiza varianței (ANOVA), cum ar fi testul lui Dunnett sau testul lui Williams (17) (18) (19) (20). Pentru rata de urgență, se pot utiliza testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecția Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel.

*Test la valori-limită*

21. Se poate efectua un test la valori-limită (o concentrație de testare și martor) atunci când nu s-au observat efecte în testul preliminar de stabilire a intervalului. Scopul testului la valori-limită este să indice faptul că valoarea de toxicitate a substanței testate este mai mare decât limita de concentrație testată. În această metodă de testare nu se poate face nicio sugestie de concentrație recomandată; se lasă acest lucru la latitudinea organismelor de reglementare. De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicate atât pentru loturile tratate, cât și pentru cele martor. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de lotul martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $p = 0,05$ ). Cu răspuns metric (rată de dezvoltare și greutate), testul  $t$  este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, varianțe omogene). În cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe, se pot utiliza testul  $t$  pentru varianțe inegale sau un test nonparametric, cum ar fi testul Wilcoxon-Mann-Whitney. Pentru rata de urgență este adecvat testul exact al lui Fisher.

**PROCEDURĂ**

**Condiții de expunere**

*Prepararea sistemului apă-sediment îmbogățit*

22. În vasele de testare se adaugă cantități corespunzătoare de sediment preparat (a se vedea punctele 13-14 și apendicele 3), pentru a forma un strat de cel puțin 1,5 cm. Se adaugă apă până la adâncimea de 6 cm (a se vedea punctul 15). Raportul între adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei nu trebuie să fie mai mare de 1:4, iar stratul de sediment nu trebuie să fie mai adânc de 3 cm. Sistemul apă-sediment trebuie să fie lăsat timp de șapte zile în condiții de aerare ușoară, înainte de adăugarea organismelor testate (a se vedea punctul 14 și apendicele 3). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și repunerea în suspensie a materiei fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive.

## ▼ M4

23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). La nevoie, în timpul studiului se completează apa până la volumul inițial, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să se facă cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri.

*Adăugarea de organisme de testare*

24. Cu patru până la cinci zile înainte de adăugarea organismelor de testare în vasele de testare, pontele trebuie să fie prelevate din culturi și plasate în vase mici, în mediu de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură vechi, provenit din cultura-mamă, sau un mediu proaspăt preparat. În cazul în care se recurge la a doua metodă, la mediul de cultură trebuie să se adauge o cantitate mică de hrană, de exemplu alge verzi și/sau câteva picături de filtrat de la o suspensie de hrană pentru pești fin măcinată (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar ponte proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze la câteva zile după ce sunt depuse ouăle (2 până la 3 zile pentru *Chironomus riparius* la 20 °C și 1 până la 4 zile pentru *Chironomus tentans* la 23 °C și *Chironomus yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvară are loc în patru stadii, fiecare cu o durată de 4-8 zile. În studiu trebuie să se utilizeze larve din primul stadiu (2-3 sau 1-4 zile după eclozare). Stadiul musculițelor poate fi verificat prin măsurarea lățimii capsulei cefalice (6).

25. Câte douăzeci de larve în primul stadiu sunt repartizate arbitrar la fiecare vas de testare care conține sediment îmbogățit și apă, cu ajutorul unei pipete cu vârful teșit. În timpul adăugării larvelor în vasele de testare trebuie să se oprească aerarea apei și ea trebuie să rămână oprită pentru încă 24 de ore după adăugarea larvelor (a se vedea punctele 24 și 32). Conform protocolului de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve utilizate în funcție de concentrație este 60 pentru estimarea punctuală a CE și 80 pentru determinarea CFEQ.

26. La douăzeci și patru de ore după adăugarea larvelor, substanța testată este îmbogățită în coloana de apă acoperitoare și se asigură din nou o aerare ușoară. Cu ajutorul unei pipete, se aplică mici volume de soluții de substanță testată sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul.

*Concentrațiile substanței testate*

27. Poate fi util un test de stabilire a intervalului, pentru a determina gama de concentrații pentru testul definitiv. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații de substanță testată, distribuite la intervale largi. Pentru a obține aceeași densitate de suprafață pentru chironomide, care va fi utilizată pentru testul definitiv, chironomidele sunt expuse la fiecare concentrație a substanței testate pentru o perioadă care permite estimarea unor concentrații de testare adecvate și nu este nevoie de duplicate.

28. Concentrațiile de testare pentru testul definitiv sunt decise pe baza rezultatului obținut în testul de stabilire a intervalului. Trebuie să se utilizeze cel puțin cinci concentrații, care să fie alese după metoda descrisă la punctele 18-20.

*Martori*

29. În test trebuie să se includă vase cu probe-martor, care să nu conțină nicio substanță testată, dar în care să se afle sediment, cu un număr corespunzător de duplicate (a se vedea punctele 19-20). În cazul în care pentru aplicarea substanței testate s-a utilizat un solvent (a se vedea punctul 16), trebuie să se adauge un martor de solvent pentru sediment.

▼ **M4***Sistem de testare*

30. Sunt utilizate sisteme statice. Sisteme semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi folosite în cazuri excepționale, de exemplu în cazul în care specificațiile privind calitatea apei devin inadecvate pentru organismul testat sau afectează echilibrul chimic (de exemplu, nivelurile de oxigen dizolvat scad prea mult, concentrația de produse excretore crește prea mult sau minerale se dizolvă din sediment și afectează pH-ul și/sau duritatea apei. Totuși, în mod normal, alte metode de ameliorare a calității apei acoperitoare, cum ar fi aerarea, vor fi suficiente și de preferat.

*Hrană*

31. Larvele trebuie să fie hrănite, de preferință zilnic sau cel puțin de trei ori pe săptămână. Hrana pentru pești (o suspensie în apă sau hrană măcinată fin, de exemplu TetraMin sau TetraPhyll; a se vedea detalii în apendicele 2), o cantitate de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) pentru fiecare larvă, zilnic, pare adecvată pentru larvele tinere în primele 10 zile. Pentru larvele mai mature poate fi necesară o cantitate de hrană ceva mai mare: o cantitate zilnică de 0,5-1 mg pentru fiecare larvă ar trebui să fie suficientă pentru restul testului. Rația de hrană trebuie să fie redusă în toate loturile tratate și în loturile martor, în cazul în care se observă creștere fungică sau atunci când se constată mortalitate în loturile martor. Atunci când nu se poate opri proliferarea fungică, testul trebuie să fie repetat. La testarea unor substanțe cu capacitate mare de adsorbție (de exemplu, cu  $\log K_{ow} > 5$ ) sau a unor substanțe cu legătură covalentă cu sedimentul, cantitatea de hrană necesară pentru asigurarea supraviețuirii și creșterii naturale a organismelor poate fi adăugată la sedimentul preparat înainte de perioada de stabilizare. Pentru aceasta, trebuie să se utilizeze material vegetal în loc de hrană pentru pești, de exemplu se poate adăuga o cantitate de 0,5 % (greutate uscată) frunze măcinate mărunț de urzică (*Urtica dioica*), de dud (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de alt material vegetal (*Cerophyl* sau celuloză alfa).

*Condiții de incubare*

32. Aerarea ușoară a apei acoperitoare în vasele de testare se face, de preferință, cu 24 de ore după adăugarea larvelor și este urmărită pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenție concentrației de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din VSA). Aerarea se face printr-o pipetă Pasteur din sticlă, fixată la 2-3 cm deasupra stratului de sediment (adică una sau câteva bule de aer pe secundă). La testarea substanțelor chimice volatile, e bine să se aibă grijă să nu se aereze sistemul apă-sediment.
33. Testul se face la o temperatură constantă de 20 °C ( $\pm 2$  °C). Pentru *C. tentans* și *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C și respectiv 25 °C ( $\pm 2$  °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar nivelul de iluminare trebuie să fie de 500-1 000 de lux.

*Durata de expunere*

34. Expunerea începe cu adăugarea de larve la vasele cu probe îmbogățite și la cele cu probe-martor. Durata maximă de expunere este de 28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care musculițele ies mai devreme, testul poate fi încheiat după cel puțin cinci zile de la emergența ultimului adult din lotul-martor.

**OBSERVAȚII***Emergență*

35. Se determină perioada de dezvoltare și numărul total de musculițe masculi și femele deplin ieșite din stadiul de larvă. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.



▼ **M4**

36. Vasele de testare trebuie să fie controlate cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a evalua vizual orice comportament anormal (de exemplu, părăsirea sedimentului, un mod neobișnuit de a înota), prin comparație cu lotul martor. În perioada de urgență probabilă este nevoie să se numere zilnic musculițele ieșite din stadiul de larvă. Zilnic se înregistrează sexul și numărul musculițelor ieșite complet din stadiul de larvă. După identificare, musculițele sunt scoase din vase. Orice ponte depuse înainte de terminarea testului trebuie să fie înregistrate și apoi înlăturate, pentru a preveni reintroducerea larvelor în sediment. De asemenea, se înregistrează numărul de pupe vizibile la care nu s-a produs urgența. În apendicele 5 se oferă orientări privind măsurarea urgenței.

*Creștere și supraviețuire*

37. În cazul în care este nevoie de datele pe 10 zile privind supraviețuirea și creșterea larvelor, trebuie să se prevadă de la început vase de testare suplimentare, pentru a putea fi utilizate ulterior. Sedimentul din aceste vase suplimentare este cernut printr-o sită de 250 μm, pentru reținerea larvelor. Simptomele care indică moartea larvelor sunt imobilitatea sau lipsa de reacție la stimuli mecanici. Larvele care nu sunt recuperate trebuie să fie numărate tot ca larve moarte (există posibilitatea ca larvele care au murit la începutul testului să fi fost degradate de microbi). Se determină greutatea uscată (fără resturi de la larvele moarte) a larvelor supraviețuitoare din fiecare vas de testare, apoi se calculează greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas. Este util să se determine în ce stadiu de dezvoltare se află larvele supraviețuitoare; pentru aceasta, se poate măsura lățimea capsulei cefalice a fiecărui individ.

**Măsurători analitice***Concentrația substanței testate*

38. Cerința minimă este ca probe din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment să fie analizate la începutul testului (de preferință, la o oră după aplicarea substanței testate) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai scăzută. Aceste determinări ale concentrației substanței testate furnizează informații despre comportamentul/partiția substanței testate în sistemul apă-sediment. Prelevarea de probe din sediment la începutul testului poate influența sistemul de testare (de exemplu, prin înlăturarea larvelor), astfel încât trebuie să se utilizeze vase de testare suplimentare pentru efectuarea determinărilor analitice la începutul și în timpul testului, după caz (a se vedea punctul 39). S-ar putea ca măsurătorile în sediment să nu fie necesare, în cazul în care partiționarea substanței testate între apă și sediment a fost clar determinată în cadrul unui studiu apă/sediment, în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment/apă, tipul de aplicare, conținutul de carbon organic al sedimentului).
39. Atunci când se fac măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a șaptea) și când pentru analiză este nevoie de probe mari, care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe probe din vase de testare suplimentare, tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.
40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C, timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța testată nu adsorbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

▼ **M4***Parametri fizico-chimici*

41. PH-ul, oxigenul dizolvat în apa de testare și temperatura din vasele de testare trebuie să fie măsurate în mod corespunzător (a se vedea punctul 10). Duritatea și conținutul de amoniac trebuie să fie măsurate în loturile martor și într-un vas de testare, la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

**DATE ȘI RAPORT***Interpretarea rezultatelor*

42. Scopul acestui test este să se determine efectul unei substanțe testate asupra ratei de dezvoltare și asupra numărului total de musculițe masculi și femele ieșite complet din stadiul de larvă sau, în cazul testului de 10 zile, efectele asupra supraviețuirii și greutateii larvelor. În cazul în care nu există indicații privind sensibilități diferite, din punct de vedere statistic, rezultatele obținute de la masculi și de la femele pot fi grupate, în scop statistic. Diferențele de sensibilitate între sexe pot fi interpretate statistic, de exemplu cu ajutorul unui test tabelar  $\chi^2$ -r  $\times 2$ . După zece zile trebuie să se determine rata de supraviețuire a larvelor și greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas, unde este cazul.
43. Concentrațiile de efect exprimate ca și concentrații în apa acoperitoare sunt calculate, de preferință, pe baza concentrațiilor măsurate la începutul testului (a se vedea punctul 38).
44. Pentru a calcula o estimare punctuală pentru  $CE_{50}$  sau orice altă  $CE_x$ , se pot utiliza statisticile pentru fiecare vas, ca duplicate adevărate. La calcularea intervalului de încredere pentru orice  $CE_x$ , trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de redusă încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la statistica pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității varianței. Totuși, valorile  $CE_x$  trebuie să fie calculate după ce reacția revine la valoarea originală.
45. Atunci când analiza statistică are ca scop determinarea CFEO/CMEO prin testarea ipotezei statistice, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, de exemplu printr-o analiză a varianței cu mai multe criterii de clasificare. Alternativ, mai multe teste robuste (21) pot fi potrivite în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite.

*Rată de emergență*

46. Ratele de emergență sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se așteaptă o relație doză-reacție de tip monoton li când aceste date corespund așteptărilor. În caz contrar, se pot utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haenszel, cu valori p ajustate Bonferroni-Holm. În cazul în care există dovezi că variabilitatea între probe duplicat este mai mare, la aceeași concentrație, decât cea indicată de o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în (21).
47. Se determină suma musculițelor ieșite în fiecare vas,  $n_e$ , care se împarte la numărul de larve introduse,  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼ **M4**

unde:

ER = rata de urgență

$n_e$  = numărul de musculițe ieșite în fiecare vas

$n_a$  = numărul de larve introduse în fiecare vas

48. O alternativă mai potrivită pentru probele de dimensiuni mari, atunci când există varianță extra-binomială, este tratarea ratei de urgență ca o reacție continuă și utilizarea unor proceduri, cum ar fi testul lui William, atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton, care corespunde cu aceste date ER. Testul lui Dunnett este potrivit în cazurile în care nu există monotonie. O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind un număr mai mare de cinci musculițe ieșite și cinci musculițe neieșite, pentru fiecare probă identică (vas).
49. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile ER trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea trigonometrică sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza varianțele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea trigonometrică este aplicată prin preluarea arcsinusului ( $\sin^{-1}$ ) rădăcinii pătrate a ER.

50. Pentru rate de urgență, valorile  $CE_x$  sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [sau, de exemplu, probit (22), logit, Weibull, un program informatic comercial corespunzător etc.]. În cazul în care analiza de regresie nu are succes (de exemplu, atunci când există mai puțin de două reacții parțiale), se utilizează alte metode nonparametrice, cum ar fi media mobilă sau interpolarea simplă.

*Rată de dezvoltare*

51. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și urgența cohorței experimentale de musculițe. (Pentru calculul duratei reale de dezvoltare, trebuie să se ia în considerare vârsta larvelor la momentul introducerii). Rata de dezvoltare este inversul duratei de dezvoltare (unitate: 1/zi) și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate a sedimentelor, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, procedurile de testare parametrică puternice se pot utiliza mai curând pentru rata de dezvoltare, decât pentru durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca reacție continuă, valorile  $CE_x$  pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu (23), (24)].
52. Pentru testele statistice următoare, se presupune că numărul de musculițe observate la inspecția din ziua  $x$  au ieșit la jumătatea intervalului de timp dintre ziua  $x$  și ziua  $x - 1$  ( $l$  = lungimea intervalului de inspecție, de obicei o zi). Rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas ( $\bar{x}$ ) este calculată cu formula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

unde:

$\bar{x}$ : rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas

$i$ : indicele intervalului de inspecție

$m$ : numărul maxim de intervale de inspecție

**▼ M4**

$f_i$ : numărul de musculițe ieșite în intervalul de inspecție  $i$

$n_e$ : numărul total de musculițe ieșite la sfârșitul experimentului ( $= \sum f_i$ )

$x_i$ : rata de dezvoltare a musculițelor ieșite în intervalul  $i$

$$x_i = 1 / \left( \text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

unde:

$\text{ziua}_i$ : ziua inspecției (zile de la aplicare)

$l_i$ : lungimea intervalului de inspecție  $i$  (zile, de obicei 1 zi)

**Raport de testare**

53. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

*Substanța testată:*

- natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];
- datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate.

*Speciile folosite pentru testare:*

- animalele de testare utilizate: specie, denumire științifică, sursa organismelor și condițiile de reproducere;
- informații privind manipularea pontelor și a larvelor;
- vârsta animalelor testate la inserarea în vasele de testare.

*Condițiile de testare:*

- sedimentul folosit, adică sediment natural sau preparat;
- pentru sedimentul natural, localizarea și descrierea locului de prelevare a probelor, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristici: pH, conținut de carbon organic, raport C/N și granulometrie (dacă este cazul);
- prepararea sedimentului: ingrediente și caracteristici (conținut de carbon organic, pH, umiditate etc. la începutul testului);
- pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate etc. la începutul testului);
- adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;
- volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului ud cu și fără apă interstițială;
- vasele de testare (material și dimensiune);
- metoda de preparare a soluțiilor stoc și concentrațiile de testare;

**▼ M4**

- aplicarea substanței testate; concentrația de testare utilizată, numărul de duplicate și utilizarea unui solvent, dacă este cazul;
- condițiile de incubare: temperatură, ciclu de lumină și nivel de iluminare, aerare (frecvență și intensitate);
- informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

*Rezultatele:*

- valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasul de testare;
- calitatea apei în vasele de testare, adică pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și conținutul de amoniac;
- înlocuirea apei de testare evaporate, dacă este cazul;
- numărul de musculițe masculi și femele ieșite în fiecare vas și în fiecare zi;
- numărul de larve care nu s-au transformat în musculițe, în fiecare vas;
- greutatea medie individuală a larvelor în fiecare vas și pentru fiecare stadiu larvar, dacă este cazul;
- procentul de emergență pe fiecare probă identică și concentrația de testare (musculițe masculi și femele, împreună);
- rata medie de dezvoltare a musculițelor complet ieșite din stadiul de larvă pe fiecare probă identică și rata de tratare (musculițe masculi și femele împreună);
- estimări ale efectelor toxice, de exemplu  $CE_x$  (și intervalele de încredere asociate), CFEO și/sau CMEO și metode statistice utilizate pentru determinarea lor;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. În ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

▼ **M4**

- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report. Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (14) Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”,
- (15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20: 482-491.
- (19) 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.
- (20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48:577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.
- (24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, Toxicol. Sci. 66: 298-312.

**▼ M4***Apendicele 1***DEFINIȚII**

În cadrul prezentei metode de testare se folosesc următoarele definiții și prescurtări:

**Sedimentul preparat** sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic: un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

**Apa acoperitoare:** apa plasată peste sediment în vasul de testare.

**Apa interstițială:** apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

**Apa îmbogățită:** apa la care s-a adăugat substanța testată.

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼ **M4***Apendicele 2***Recomandări pentru cultura de *Chironomus riparius***

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip cuarțos într-un strat subțire, de circa 5-10 mm grosime. Un substrat adecvat s-a dovedit a fi și kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm. Apoi se adaugă apa corespunzătoare, la o adâncime de câțiva cm. Nivelurile de apă trebuie să fie completate la nevoie, pentru a compensa pierderea prin evaporare și pentru a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cutie adecvată, pentru a nu permite ca adulții emergenți să scape. Cutia trebuie să fie suficient de mare pentru a permite mișcarea în voie a adulților emergenți, altfel este posibil să nu apară populația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).
2. Cutiile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la  $20 \pm 2$  °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (la un nivel de iluminare de circa 1 000 de lux), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

**Apa de diluție**

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit, se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă tuburile de larve.

**Hrănirea larvelor**

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă patentată similară de hrană pentru pești) la aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi administrată sub formă de pulbere măcinată uscată sau ca suspensie în apă: o cantitate de 1,0 g de hrană sub formă de fulgi se adaugă la 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat la o rată de circa 5 ml pentru fiecare vas și fiecare zi (a se agita înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai mare pot primi mai mult.
5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „neclar”, trebuie să se micșoreze cantitatea de hrană. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină mâncare va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.
6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

**Hrănirea adulților ieșiți din larve**

7. Unele experimente au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții ieșiți din larve un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.



**▼ M4****Emergență**

8. La  $20 \pm 2$  °C, adulții vor începe să iasă din vasele de creștere a larvelor, după aproximativ 13-15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

**Ponte**

9. După ce adulții sunt prezenți în cutia de creștere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de ponte gelatinoase. Dacă aceasta apare, pontele trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține o probă din apa în care au crescut. Pontele sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2-4 ponte/vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.
10. Larvele în primul stadiu trebuie să eclozeze după 2-3 zile.

**Pregătirea de noi vase de cultură**

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce muscușele adulte au ieșit din larve. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de manipulare.

**Pregătirea soluțiilor de testare „M4” și „M7”**

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este preparat la fel ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1, pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai scăzute în „M7” față de „M4”. Este în pregătire o publicație privind mediul „M7” (Elendt, comunicare personală). Soluția de testare nu trebuie să fie preparată conform indicațiilor lui Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de  $\text{NaSiO}_3$ ,  $5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  și  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  indicate pentru prepararea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

**Prepararea mediului „M7”**

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). Cincizeci de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 se adaugă la un litru de apă deionizată, pentru a prepara mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. (Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote). Mediul este aerat și stabilizat.

**Tabelul 1****Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7**

| Soluții stoc (I)                                | Cantitate (mg)<br>adăugată la un litru<br>de apă deionizată | Pentru a prepara soluția stoc combinată<br>(II): se amestecă următoarele cantități<br>(ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un<br>litru de apă deionizată |      | Concentrații finale în soluțiile de<br>testare (mg/l) |       |
|---|---|--|------|---|-------|
|   |   | M4   | M7   | M4  | M7    |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)                     | 57 190  | 1,0  | 0,25 | 2,86  | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ (1) | 7 210   | 1,0  | 0,25 | 0,361   | 0,090 |
| $\text{LiCl}$ (1)                               | 6 120   | 1,0  | 0,25 | 0,306   | 0,077 |

▼ **M4**

| Soluții stoc (I)  | Cantitate (mg) adăugată la un litru de apă deionizată | Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un litru de apă deionizată |      | Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l) |         |
|---|---|---|------|--|---------|
|   |   | M4  | M7   | M4   | M7      |
| RbCl <sup>(1)</sup>   | 1 420   | 1,0   | 0,25 | 0,071  | 0,018   |
| SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 3 040   | 1,0   | 0,25 | 0,152  | 0,038   |
| NaBr <sup>(1)</sup>   | 320   | 1,0   | 0,25 | 0,016  | 0,004   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>    | 1 260   | 1,0   | 0,25 | 0,063  | 0,016   |
| CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 335   | 1,0   | 0,25 | 0,017  | 0,004   |
| ZnCl <sub>2</sub>   | 260   | 1,0   | 1,0  | 0,013  | 0,013   |
| CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                                  | 200   | 1,0   | 1,0  | 0,010  | 0,010   |
| KI  | 65  | 1,0   | 1,0  | 0,0033   | 0,0033  |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>  | 43,8  | 1,0   | 1,0  | 0,0022   | 0,0022  |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>   | 11,5  | 1,0   | 1,0  | 0,00058  | 0,00058 |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> | 5 000   | 20,0  | 5,0  | 2,5  | 0,625   |
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>    | 1 991   | 20,0  | 5,0  | 1,0  | 0,249   |

<sup>(1)</sup> Aceste substanțe diferă în M4 și M7, așa cum s-a indicat mai sus.

<sup>(2)</sup> Aceste soluții sunt preparate individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavizate imediat.

Tabelul 2

**Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7**

|   | Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg) | Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 293 800   | 1,0   | 293,8   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O  | 246 600   | 0,5   | 123,3   |
| KCl                                     | 58 000  | 0,1   | 5,8   |
| NaHCO <sub>3</sub>                      | 64 800  | 1,0   | 64,8  |
| NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O | 50 000  | 0,2   | 10,0  |
| NaNO <sub>3</sub>                       | 2 740   | 0,1   | 0,274   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 1 430   | 0,1   | 0,143   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>         | 1 840   | 0,1   | 0,184   |

▼ **M4**

Tabelul 3

**Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7**

Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a se obține o singură soluție stoc de vitamine.

|                       | Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg) | Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|-----------------------|---|---|---|
| Clorhidrat de tiamină | 750   | 0,1   | 0,075   |
| Ciancobalamină (B12)  | 10  | 0,1   | 0,0010  |
| Biotină               | 7,5   | 0,1   | 0,00075   |

**BIBLIOGRAFIE:**

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

Elenđt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, *Protoplasma* 154: 25-33.

Elenđt B.P. and Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Apendicele 3***PREPARAREA SEDIMENTULUI****Compoziția sedimentului**

Compoziția sedimentului preparat trebuie să fie următoarea:

| Constituent        | Caracteristici  | % de sediment greutate uscată |
|--------------------|---|-------------------------------|
| Turbă              | Mușchi de turbă (Sphagnum), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5-6,0, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor $\leq 1$ mm) și uscat cu aer | 4-5                           |
| Nisip cuarțos      | Granulație: $> 50$ % din particule trebuie să fie în intervalul 50-200 $\mu\text{m}$  | 75-76                         |
| Argilă caolinitică | Conținut de caolinit $\geq 30$ %  | 20                            |
| Carbon organic     | Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip  | 2 ( $\pm 0,5$ )               |
| Carbonat de calciu | $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, pur din punct de vedere chimic  | 0,05-0,1                      |
| Apă                | Conductivitate $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$   | 30-50                         |

**Preparare**

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la  $5,5 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ . Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la  $20 \pm 2$  °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie între  $6,0 \pm 0,5$ . Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolin) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în gama de 30-50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, se recomandă ca sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

**Depozitare**

Constituenții uscați pentru prepararea sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în cadrul testului. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea.

**BIBLIOGRAFIE:**

Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

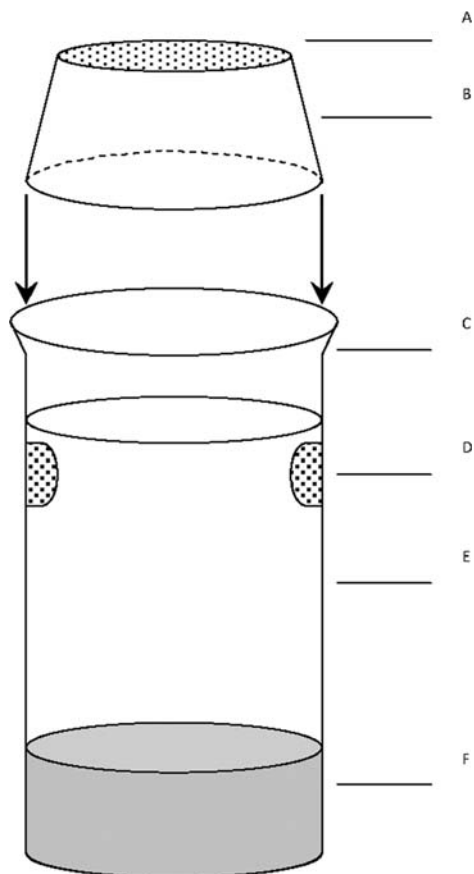
▼ **M4***Apendicele 4***Caracteristici chimice acceptabile ale apei de diluție**

| Substanță   | Concentrații   |
|---|----------------|
| Particule în suspensie                                    | < 20 mg/l      |
| Carbon organic total                                      | < 2 mg/l       |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l       |
| Duritate ca CaCO <sub>3</sub>                             | < 400 mg/l (*) |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l      |
| Total pesticide organofosforice                           | < 50 ng/l      |
| Total pesticide organofosforice plus bifenil policlorurat | < 50 ng/l      |
| Total clor organic  | < 25 ng/l      |

(\*) Totuși, trebuie notat faptul că în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).

▼ **M4***Apendicele 5***Orientări pentru monitorizarea emergenței larvelor de chironomide**

Pe paharele Berzelius de testare sunt plasate capcane de emergență. Aceste capcane sunt necesare începând din a douăzecea zi până la sfârșitul testului. În figura de mai jos se prezintă un exemplu de capcană utilizată:



- |   |   |
|---|---|
| A: sită de nailon                               | D: orificii cu sită, pentru schimbul de apă |
| B: cupe de plastic răsturnate                   | E: apă                                      |
| C: pahar Berzelius fără muchie, pentru expunere | F: sediment                                 |

▼ **M4****C.29. BIODEGRADABILITATEA RAPIDĂ – CO<sub>2</sub> ÎN VASE ÎNCHISE  
ERMETIC (TESTARE ÎN SPAȚIUL LIBER)****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 310 (2006). Această metodă de testare este o metodă de screening pentru evaluarea biodegradabilității rapide a substanțelor chimice și furnizează informații similare celor obținute din cele șase metode de testare descrise la capitolul C.4 din prezenta anexă, A-F. Prin urmare, o substanță chimică care prezintă rezultate pozitive în cadrul acestei metode de testare poate fi considerată ca fiind ușor biodegradabilă și, în consecință, cu degradare rapidă în mediu.
  
2. Metoda bine stabilită (1) privind dioxidul de carbon (CO<sub>2</sub>), bazată pe testul Sturm original (2) pentru evaluarea biodegradabilității substanțelor chimice organice prin măsurarea dioxidului de carbon produs prin activitatea microbiană, a reprezentat, de obicei, prima alegere pentru testarea substanțelor chimice greu solubile și a celor care se adsorb puternic. Aceasta este selectată, de asemenea, pentru substanțele chimice solubile (nu însă și volatile), întrucât mulți consideră că degajarea dioxidului de carbon reprezintă singura dovadă fără echivoc a activității microbiene. Eliminarea carbonului organic dizolvat se poate realiza prin procese fizico-chimice – adsorbție, volatilizare, precipitare, hidroliză –, precum și prin activitate microbiană și prin numeroase reacții nebiologice care consumă oxigen; CO<sub>2</sub> rezultă rareori din substanțe chimice pe cale abiotică. În testul Sturm original și în cel modificat (1) (2), CO<sub>2</sub> este eliminat din faza lichidă în vase de adsorbție prin barbotare (adică prin trecerea forțată a aerului tratat sub formă de bule prin mediul lichid pentru a elimina CO<sub>2</sub>), în timp ce în varianta Larson (3) (4), CO<sub>2</sub> este transferat din vasul de reacție în vasele de adsorbție prin trecerea aerului fără CO<sub>2</sub> prin spațiul liber și, în plus, prin agitarea continuă a vasului de testare. Agitarea vasului de reacție se realizează numai în modificarea Larson; amestecarea este menționată numai pentru substanțele insolubile în ISO 9439 (5) și în varianta americană originală (6), ambele menționând barbotarea în locul înlocuirii spațiului liber. În altă metodă oficială a US EPA (Agenția americană pentru protecția mediului) (7), bazată pe metoda Gledhill (8), vasul de reacție agitat este izolat de atmosferă, iar CO<sub>2</sub> produs este colectat într-un separator alcalin interior direct din faza gazoasă, precum în cazul respirometrelor clasice Warburg/Barcroft.
  
3. Totuși, s-a demonstrat că, în timpul utilizării testului Sturm standard modificat, pentru o serie de substanțe chimice, carbonul anorganic (CA) se acumulează în mediu (9). Degradarea a 20 mg C/l de anilină a produs o concentrație de CA de 8 mg/l. Astfel, colectarea de CO<sub>2</sub> în separatoarele alcaline nu a reflectat fidel cantitatea de CO<sub>2</sub> produsă pe cale microbiologică în etapele intermediare din timpul degradării. Drept urmare, specificația referitoare la faptul că > 60 % din producția maximă teoretică de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>T) trebuie colectată într-o „fereastră de 10 zile” (cele 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % biodegradare) pentru ca o substanță chimică testată să fie clasificată ca ușor biodegradabilă, nu va fi îndeplinită de unele substanțe chimice care ar fi clasificate astfel folosind eliminarea carbonului organic dizolvat (COD).
  
4. Atunci când procentul de degradare are o valoare mai scăzută decât cea preconizată, este posibil ca în soluția experimentală să se acumuleze CA. În acest caz, degradabilitatea poate fi evaluată folosind celelalte teste de biodegradabilitate rapidă.

## ▼M4

5. Alte inconveniente ale metodei Sturm (greoaie, necesită mult timp, mai expusă la erori experimentale și nu este aplicabilă substanțelor chimice volatile) au determinat deja căutarea unei tehnici în vase închise ermetic, diferite de tehnica Gledhill, în locul circulației continue a gazului (10) (11). Boatman *et al.* (12) au analizat metodele anterioare și au adoptat un sistem cu spațiu liber închis în care CO<sub>2</sub> a fost eliberat în spațiul liber, la sfârșitul incubării, prin acidificarea mediului. CO<sub>2</sub> a fost măsurat prin cromatografie în faza gazoasă (CG)/analiza CA în probe prelevate automat din spațiul liber, însă nu s-a ținut cont de carbonul anorganic dizolvat (CAD) în faza lichidă. De asemenea, vasele folosite au fost foarte mici (20 ml) conținând numai 10 ml din mediu, ceea ce a determinat probleme, de exemplu atunci când se adaugă în mod obligatoriu cantități foarte mici de substanțe chimice de testat insolubile și/sau este posibil ca în mediul inoculat să nu existe sau să fie prezent un număr insuficient de microorganisme responsabile pentru degradarea substanțelor chimice testate.
6. Aceste dificultăți au fost depășite de studiile independente derulate de Struijs și Stoltenkamp (13) și de Birch și Fletcher (14), cel din urmă fiind inspirat de experiența acestora cu aparatura utilizată în testul de biodegradare anaerobă (15). În prima metodă menționată (13), CO<sub>2</sub> se măsoară în spațiul liber după acidificare și echilibrare, în timp ce în a doua metodă (14) CAD a fost măsurat în ambele faze, gazoasă și lichidă, fără interpretarea rezultatelor; mai mult de 90 % din CA format a fost prezent în faza lichidă. Ambele metode au prezentat avantaje față de testul Sturm prin faptul că sistemul de testare a fost mult mai compact și manijabil, pot fi testate substanțe chimice volatile și se previne posibilitatea de întârziere în măsurarea CO<sub>2</sub> produs.
7. Cele două abordări au fost combinate în standardul ISO privind CO<sub>2</sub> în spațiul liber (16), care a supus unui test de comparare interlaboratoare (17) și reprezintă standardul care stă la baza prezentei metode de testare. Cele două abordări au fost utilizate, în mod similar, în metoda US EPA (18). Au fost recomandate două metode de măsurare a CO<sub>2</sub>, respectiv CO<sub>2</sub> în spațiul liber după acidificare (13) și CA în faza lichidă după adăugarea de substanță alcalină în exces. Ultima metodă a fost introdusă de Peterson în timpul testului de comparare interlaboratoare CONCAWE (19) al acestei metode a spațiului liber, modificată pentru măsurarea biodegradabilității intrinseci. Modificările aduse în 1992 (20) la revizuirea metodelor de la capitolul C.4 din prezenta anexă cu privire la biodegradabilitatea rapidă au fost încorporate în această metodă de testare, astfel încât condițiile (mediu, durată etc.) sunt asemănătoare cu cele din testul Sturm revizuit (20). Birch și Fletcher (14) au demonstrat că în această testare în spațiul liber s-au obținut rezultate foarte apropiate de cele obținute cu aceleași substanțe chimice în cadrul testului de comparare interlaboratoare realizat de OCDE (21) al metodelor de testare revizuite.

## PRINCIPIUL TESTULUI

8. Substanța chimică testată, de obicei la o concentrație de 20 mg C/l, ca sursă unică de carbon și energie, este incubată într-un mediu de soluție tampon cu săruri minerale care a fost inoculat cu o populație mixtă de microorganisme. Testul se realizează în vase închise ermetic cu un spațiu liber plin cu aer, care asigură o rezervă de oxigen pentru biodegradarea aerobă. Degajarea CO<sub>2</sub> rezultat în urma biodegradării aerobe finale a substanței chimice testate se determină prin măsurarea excesului de CA produs în vasele de testare față de cel produs în vasele cu probă martor care conțin numai mediul inoculat. Gradul de biodegradare se exprimă ca procent din producția maximă teoretică de CA (CATH), pe baza cantității de substanță chimică testată (exprimată în carbon organic) adăugată inițial.
9. De asemenea, poate fi măsurată eliminarea COD și/sau gradul de biodegradare primară al substanței chimice testate (20).



▼ **M4**

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

10. Conținutul de carbon organic (% masice) al substanței chimice care urmează a fi testată trebuie să fie cunoscut, fie pe baza structurii sale chimice, fie prin măsurare, astfel încât să poată fi calculat procentul de degradare. Pentru substanțele chimice volatile testate, este utilă măsurarea sau calcularea constantei legii lui Henry, pentru determinarea un raport volumetric spațiu liber-lichid adecvat. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor este utilă în selectarea unei concentrații adecvate a substanței testate și în interpretarea rezultatelor care indică o biodegradabilitate redusă: se recomandă includerea verificării efectului inhibitor, exceptând cazul în care se cunoaște faptul că substanța chimică testată nu inhibă activitățile microbiene (a se vedea punctul 24).

## APLICABILITATEA METODEI

11. Testul este aplicabil substanțelor chimice testate solubile și insolubile în apă, trebuind totuși să se asigure o bună dispersie a substanței chimice testate. Utilizând raportul volumetric spațiu liber-lichid recomandat de 1:2, pot fi testate substanțe chimice volatile având o constantă a legii lui Henry de până la  $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  întrucât proporția substanței chimice testate în spațiul liber nu va depăși 1 % (13). Se poate utiliza un volum mai mic al spațiului liber atunci când se testează substanțe chimice mai volatile, însă biodisponibilitatea acestora poate fi limitativă, mai ales dacă acestea prezintă o solubilitate redusă în apă. Totuși, utilizatorii trebuie să se asigure că raportul volumetric spațiu liber-lichid și concentrația substanței chimice testate sunt de așa natură încât este disponibil suficient oxigen pentru a se produce biodegradarea aerobă completă (de exemplu, evitarea utilizării unei concentrații mari a substratului și a unui volum mic al spațiului liber). Referințele (13) și (23) conțin informații privind această chestiune.

## SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

12. Pentru a verifica procedura de testare, ar trebui testată în paralel o substanță chimică de referință a cărei biodegradabilitate este cunoscută. În acest scop, poate fi utilizată anilină, benzoat de sodiu sau etilenglicol, atunci când se testează substanțe chimice testate solubile în apă, și 1-octanol, pentru substanțe chimice testate cu solubilitate redusă (13). Biodegradarea acestor substanțe chimice trebuie să atingă > 60 % CATH în decurs de 14 zile.

## REPRODUCIBILITATE

13. În testul de comparare interlaboratoare a metodei realizat de ISO (17), s-au obținut următoarele rezultate la utilizarea condițiilor recomandate, incluzând 20 mg C substanță chimică testată/l.

| Substanță chimică testată: | Procent mediu de biodegradare (28 de zile) | Coefficient de variație (%) | Număr de laboratoare |
|----------------------------|--|-----------------------------|----------------------|
| Anilină                    | 90   | 16                          | 17                   |
| 1-Octanol                  | 85   | 12                          | 14                   |

Variabilitatea în interiorul testului (reproductibilitatea), folosind anilină, a fost redusă, cu coeficienți de variabilitate care nu au depășit 5 % în aproape toate testele. În două cazuri în care reproductibilitatea a fost ceva mai redusă, este posibil ca variabilitatea mai mare să se fi datorat producției mari de CA în probele martor. Reproducibilitatea a fost ceva mai redusă cu 1-octanol, însă aceasta s-a situat totuși sub 10 % pentru 79 % din teste. Această variabilitate în interiorul testului este posibil să se datoreze erorilor de dozare, întrucât a trebuit injectat un volum mic de 1-octanol (3-4  $\mu\text{l}$ ) în vasele de testare închise ermetic. Coeficienți de variație mai mari ar trebui să rezulte când sunt utilizate concentrații mai scăzute de substanță chimică testată, în special la concentrații sub 10 mg C/l. Această problemă ar putea fi depășită parțial prin reducerea concentrației carbonului anorganic total (CAT) din proba de inocul.

▼ **M4**

14. Într-un test de comparare interlaboratoare realizat în UE (24) pentru cinci agenți tensioactivi adăugați cu concentrația de 10 mg C/l, s-au obținut următoarele rezultate:

| Substanță chimică testată:                              | Procent mediu de biodegradare (28 de zile) | Coeeficient de variație (%) | Număr de laboratoare |
|---|--|-----------------------------|----------------------|
| Tetra-propilen benzen sulfonat                          | 17   | 45                          | 10                   |
| Di-izo-octilsulfo-succinat (anionic)                    | 72   | 22                          | 9                    |
| Clorura de hexadecil-trimetil amoniu (*) (cationic)     | 75   | 13                          | 10                   |
| Izo-nonilfenol -(eto-xilat) <sub>9</sub> (neionic)      | 41   | 32                          | 10                   |
| Coco-amido-propil dimetilhidroxi sulfobetaină (amfoter) | 60   | 23                          | 11                   |

(\*) Pentru neutralizarea toxicității a fost adăugat SiO<sub>2</sub>.

Rezultatele indică faptul că, în general, variabilitatea a fost mai mare pentru agenții tensioactivi mai puțin degradați. Variabilitatea în interiorul testului a fost sub 15 % pentru aproximativ 90 % din cazuri, cea mai mare atingând 30-40 %.

*Notă:* Majoritatea agenților tensioactivi nu sunt specii moleculare unice, ci sunt amestecuri de izomeri, omologi etc. care se degradează după perioade de latență caracteristice diferite și cu cinetici diferite având ca rezultat curbe „neclare”, atenuate astfel încât este posibil ca valoarea pragului de 60 % să nu poată fi atinsă în „fereastra de 10 zile”, chiar dacă fiecare specie moleculară, considerată individual, ar atinge > 60 % în intervalul de 10 zile dacă ar fi testată individual. Acest fenomen poate fi observat și în cazul altor amestecuri complexe.

#### DESCRIEREA METODEI

##### *Aparatură*

15. Aparatură obișnuită de laborator și:
- flacoane serologice din sticlă, închise ermetic cu dopuri de cauciuc butilic și capsule din aluminiu sertizate. Mărimea recomandată este de „125 ml”, care are un volum total de aproximativ 160 ml (în acest caz, volumul fiecărui flacon ar trebui să fie cunoscut ca având  $160 \pm 1$  ml). Poate fi utilizat un flacon de dimensiuni mai mici atunci când rezultatele se conformează condițiilor descrise la punctele 66 și 67;
  - analizor de carbon sau un alt instrument (de exemplu, cromatograf în fază gazoasă) pentru măsurarea carbonului anorganic;

▼ **M4**

- (c) seringi de precizie înaltă pentru probe gazoase sau lichide;
- (d) agitator orbital într-un mediu cu temperatură controlată;
- (e) o sursă de aer fără  $\text{CO}_2$  – acesta poate fi preparat prin trecerea aerului prin granule de oxid de calciu sodat sau prin utilizarea unui amestec de gaz 80 %  $\text{N}_2$ /20 %  $\text{O}_2$  (opțional) (a se vedea punctul 28);
- (f) dispozitiv de filtrare cu membrană cu porozitatea de 0,20-0,45  $\mu\text{m}$  (opțional);
- (g) analizor de carbon organic (opțional).

*Reactivi chimici*

16. Se utilizează întotdeauna reactivi chimici cu puritate analitică.

*Apă*

17. Ar trebui să se utilizeze apă distilată sau deionizată care conține  $\leq 1$  mg/l carbon organic total. Acesta reprezintă  $\leq 5$  % din conținutul de carbon organic inițial introdus prin doza recomandată a substanței chimice testate.

*Soluții stoc pentru mediul cu săruri minerale*

18. Soluțiile stoc și mediul cu săruri minerale sunt similare celor din ISO 14593 (16) și C.4 teste de „biodegradabilitate rapidă” (20). Utilizarea unei concentrații mai mari de clorură de amoniu (2,0 g/l în loc de 0,5 g/l) ar trebui să fie necesară numai în cazuri excepționale, de exemplu, când concentrația substanței chimice testate este  $> 40$  mg C/l. Soluțiile stoc ar trebui păstrate la rece și eliminate după șase luni sau mai devreme dacă există dovezi de precipitare sau de proliferare microbiană. Se prepară următoarele șase soluții stoc:

- (a) Fosfat diacid de potasiu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 8,50 g

Fosfat acid de potasiu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 21,75 g

Fosfat acid de sodiu dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 33,40 g

Clorură de amoniu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru. pH-ul acestei soluții este 7,4 ( $\pm 0,2$ ). În caz contrar, se prepară o nouă soluție.

- (b) Clorură de calciu dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36,40 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

- (c) Sulfat de magneziu heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

- (d) Clorură de fier (III) hexahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,25 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru și se adaugă o picătură de HCl concentrat.

*Prepararea mediului mineral*

19. Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu aproximativ 800 ml apă (punctul 17), apoi se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b), (c) și (d) și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 17).

*Alți reactivi chimici*

20. Acid fosforic concentrat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ( $> 85$  % masă pe volum).

▼ **M4***Soluție de hidroxid de sodiu 7M*

21. Se dizolvă 280 g hidroxid de sodiu (NaOH) într-un litru de apă (punctul 17). Se determină concentrația CAD a acestei soluții și se consideră această valoare când se calculează rezultatul testului (a se vedea punctele 55 și 61), ținând cont mai ales de criteriul de validitate de la punctul 66 litera (b). În cazul în care concentrația CAD este prea mare, se prepară o soluție proaspătă.

*Substanța chimică testată*

22. Se prepară o soluție stoc cu o substanță chimică testată suficient de hidrosolubilă, în apă (punctul 17) sau în mediul de testare (punctul 19), la o concentrație de preferat de 100 de ori mai mare decât a concentrației finale care urmează a fi utilizată în test; poate fi necesară ajustarea pH-ului soluției stoc. Soluția stoc se adaugă mediului mineral pentru a atinge o concentrație finală a carbonului organic cuprinsă între 2 și 40 mg C/l, de preferat 20 mg C/l. Dacă sunt utilizate concentrații mai scăzute decât acestea, poate fi afectată precizia. Substanțele chimice lichide solubile și insolubile pot fi adăugate în vase direct utilizând seringi de înaltă precizie. Este posibil ca substanțele chimice testate cu solubilitate redusă sau cele insolubile să necesite un tratament special (25). Posibilitățile sunt:

- (a) adăugarea directă a unor cantități cântărite cunoscute;
- (b) dispersia ultrasonică înainte de adăugare;
- (c) poate fi necesară dispersia cu ajutorul agenților de emulsionare, înainte de adăugare, pentru a stabili dacă aceștia au efecte de inhibare sau de stimulare asupra activității microbiene;
- (d) adsorbția substanțelor chimice testate lichide sau a unei soluții într-un solvent volatil adecvat pe un mediu sau pe un suport inert (de exemplu, filtru din fibre de sticlă), urmată de evaporarea solventului, dacă se utilizează, și adăugarea directă a unor cantități cunoscute;
- (e) adăugarea unui volum cunoscut de soluție a substanței chimice testate într-un solvent ușor volatil într-un vas de testare gol, urmată de evaporarea solventului.

Agenții sau solvenții utilizați la (c), (d) și (e) trebuie testați pentru orice efect de stimulare sau inhibare a activității microbiene [a se vedea punctul 42 litera (b)].

*Substanța chimică de referință*

23. Se prepară o soluție stoc din substanța chimică de referință (solubilă), în apă (punctul 17), la o concentrație de preferat de 100 de ori mai mare decât concentrația finală (20 mg C/l) care urmează a fi utilizată în test.

*Verificarea efectului inhibitor*

24. Deseori, substanțele chimice testate nu prezintă o degradare semnificativă în condițiile utilizate pentru evaluările biodegradării rapide. Una dintre cauzele posibile este că substanța chimică testată manifestă un efect inhibitor pentru inocul la concentrația la care este aplicată în test. O verificare a efectului inhibitor poate fi inclusă în elaborarea testului pentru a ușura identificarea (retrospectivă) acestuia ca una dintre cauzele posibile sau ca factor care contribuie la aceasta. Ca alternativă, verificarea efectului inhibitor poate elimina aceste interferențe și poate demonstra că degradarea redusă sau egală cu zero este atribuibilă numai incapacității atacului microbial în condițiile de testare. Pentru a obține informații cu privire la toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (aerobe), se prepară o soluție care conține substanța chimică testată și produsul de referință în mediul de testare (punctul 19), fiecare având aceeași concentrație ca cea pe care a avut-o la adăugarea în mediul de testare în timpul testului (a se vedea punctele 22 și 23).

▼ **M4***Inocul*

25. Inoculul poate proveni din diferite surse: nămol activ; efluenți de ape uzate (neclorurați), ape de suprafață și soluri sau dintr-un amestec al acestora (20). Activitatea de biodegradare a sursei ar trebui verificată folosind o substanță chimică de referință. Indiferent de sursă, microorganismele expuse anterior la substanța chimică testată nu ar trebui folosite dacă procedura urmează a se utiliza ca test pentru biodegradabilitatea rapidă.

Avertizare: Nămolul activ, apa uzată și efluentul de apă uzată conțin organisme patogene și trebuie manipulate cu precauție.

26. S-a constatat empiric că volumul optim pentru inocul este cel care:
- este suficient pentru a oferi activitate de biodegradare adecvată;
  - degradează substanța chimică de referință cu procentul prevăzut (a se vedea punctul 66);
  - furnizează 102-105 unități formatoare colonii pe mililitru în amestecul final;
  - în mod normal, furnizează o concentrație de 4 mg/l materii solide în suspensie în amestecul final atunci când se utilizează nămol activ, pot fi utilizate concentrații de până la 30 mg/l însă pot crește semnificativ generarea de CO<sub>2</sub> a probelor martor (26);
  - contribuie cu mai puțin de 10 % la concentrația inițială a carbonului organic introdus de substanța chimică testată;
  - reprezintă, în general, 1-10 ml de inocul la 1 litru de soluție experimentală.

*Nămol activ*

27. Se prelevează o probă de nămol activ proaspăt din vasul de aerare al unei instalații de tratare a apelor uzate sau dintr-o instalație de laborator care tratează în special ape uzate menajere. Dacă este necesar, particulele grosiere ar trebui îndepărtate prin cernere (de exemplu, utilizând o sită cu ochiuri de 1 mm<sup>2</sup>), iar nămolul ar trebui ținut în condiții aerobe până la utilizare.
28. Alternativ, după îndepărtarea oricăror particule grosiere, se lasă la decantat sau se centrifughează (de exemplu, 1 100 × g timp de 10 minute). Se îndepărtează lichidul supernatant. Nămolul poate fi spălat în soluție minerală. Se prepară o suspensie de nămol concentrat în mediu mineral pentru a obține o concentrație de 3-5 g solide în suspensie/l. După aceea se aerează până în momentul folosirii.
29. Nămolul ar trebui prelevat dintr-o instalație de tratare clasică, care funcționează corect. Dacă nămolul trebuie prelevat dintr-o instalație de tratare cu debit mare sau se presupune că ar conține inhibitori, acesta ar trebui spălat. După amestecarea puternică, nămolul din noua suspensie se lasă la decantat sau se centrifughează, apoi se îndepărtează lichidul supernatant; nămolul spălat se trece din nou în suspensie într-un alt volum de mediu mineral. Se repetă această procedură până când se consideră că nămolul nu mai conține substrat sau inhibitor în exces.
30. Imediat înainte de folosire, se prelevează o probă după ce nămolul este suspensionat complet sau, după caz, din nămol netratat, pentru a determina greutatea uscată a solidelor în suspensie.
31. O altă alternativă constă în omogenizarea nămolului activ (3-5 g solide în suspensie/l). Se tratează nămolul într-un amestecător Waring timp de 2 minute la viteză medie. Se lasă apoi timp de 30 de minute, sau mai mult dacă este nevoie, la decantat și se prelevează lichidul pentru a fi folosit ca inocul într-un raport de aproximativ 10 ml/l de mediu mineral.

▼ **M4**

32. Se poate obține o reducere suplimentară a degajării de CO<sub>2</sub> prin aerarea nămolului peste noapte cu aer fără CO<sub>2</sub>. În acest test, pentru concentrația inoculului se utilizează 4 mg/l materii solide în nămolul activ (13).

*Efluenți secundari de ape uzate*

33. Alternativ, inoculul se poate obține din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care se alimentează în special cu apă uzată menajeră. Proba se menține în condiții aerobe și se folosește în ziua în care este colectată sau preconționată, dacă este necesar. Efluentul ar trebui filtrat printr-un filtru grosier pentru a îndepărta particulele mari și se măsoară valoarea pH-ului.
34. Pentru a reduce conținutul de CA, filtratul se barbotează cu aer fără CO<sub>2</sub> [punctul 15 litera (e)] timp de 1 h, în timp ce pH-ul se menține la 6,5 folosind acid fosforic (punctul 20). Se aduce valoarea pH-ului la valoarea inițială cu hidroxid de sodiu (punctul 21) și, după decantarea timp de aproximativ 1 h, se prelevează un volum adecvat de supernatant pentru inoculare. Procedura de barbotare reduce conținutul de CA al inoculului. De exemplu, când s-a utilizat ca inocul volumul maxim recomandat de efluent barbotat și filtrat (100 ml) pe litru, cantitatea de CA prezentă în vasele cu probă martor s-a situat în intervalul 0,4-1,3 mg/l (14), ceea ce reprezintă 2-6,5 % din C substanței chimice testate la 20 mg C/l și 4-13 % la 10 mg C/l.

*Ape de suprafață*

35. Se prelevează o probă dintr-o apă de suprafață adecvată. Aceasta ar trebui ținută în condiții aerobe și utilizată în ziua în care este colectată. Dacă este necesar, proba ar trebui concentrată prin filtrare sau centrifugare. Volumul de inocul care urmează a fi utilizat în fiecare vas de testare ar trebui să îndeplinească criteriile de la punctul 26.

*Soluri*

36. Se prelevează o probă de sol adecvat, colectată de la o adâncime de până la 20 cm sub suprafața solului. Din proba de sol ar trebui îndepărtate pietrele, resturile de plante și vergeturile înainte ca aceasta să fie cernută printr-o sită cu ochiuri de 2 mm (dacă proba este prea umedă pentru a fi cernută imediat, se usucă parțial cu aer pentru a ușura cernerea). Proba ar trebui ținută în condiții aerobe și utilizată în ziua colectării (dacă proba este transportată într-o pungă neagră de polietilenă care nu se închide ermetic, poate fi păstrată în pungă, la 2-4 °C, timp de o lună).

*Preconționarea inoculului*

37. Inoculul poate fi preconționat și adus în condițiile de testare, dar nu și preadaptat la substanța chimică testată. Preconționarea poate reduce degajarea de CO<sub>2</sub> a probei martor. Preconționarea constă în aerarea nămolului activ după diluarea în mediul de testare la 30 mg/l, cu aer umed fără CO<sub>2</sub>, timp de până la 5-7 zile, la temperatura de testare.

**PROCEDURA DE TESTARE***Număr de sticle*

38. Numărul de flacoane [punctul 15 litera (a)] necesar pentru un test va depinde de frecvența analizei și de durata testului.
39. Se recomandă analizarea a trei seturi de flacoane, după un număr suficient de intervale de timp astfel încât să poată fi identificată fereastra de 10 zile. De asemenea, la finalul testului se analizează cel puțin cinci flacoane de testare [punctul 15 litera (a)] din seturile (a), (b) și (c) (a se vedea punctul 42), pentru a putea calcula intervalele de încredere 95 % pentru valoarea procentuală medie a biodegradării.

▼ **M4***Mediu inoculat*

40. Inoculul se utilizează la o concentrație de 4 mg/l solide uscate în nămolul activat. Imediat înainte de utilizare se prepară suficient mediu inoculat prin adăugarea, de exemplu, a 2 ml de nămol activ, tratat în mod adecvat (punctele 27-32), la o concentrație de 2 000 mg/l la 1 litru de mediu cu săruri minerale (punctul 19). Când urmează a se utiliza efluenți secundari de ape uzate, se adaugă până la 100 ml de efluent (punctul 33) la 900 ml mediu cu săruri minerale (punctul 19) și se diluează până la 1 litru cu mediu.

*Pregătirea flacoanelor*

41. Se dozează alicote din mediu în flacoane duplicat pentru a se obține un raport spațiu liber-lichid de 1:2 (de exemplu, se adaugă 107 ml în flacoane cu capacitatea de 160 ml). Pot fi utilizate alte rapoarte, dar se ține cont de avertismentul de la punctul 11. Când se utilizează oricare dintre tipurile de inocul, trebuie avut grijă să se asigure că mediul inoculat este amestecat corespunzător pentru a se asigura distribuția uniformă în vasele de testare.
42. Seturile de flacoane [punctul 15 litera (a)] sunt preparate pentru a conține următoarele:
- (a) vase de testare (notate  $F_T$ ) care conțin substanța chimică testată;
  - (b) vase martor (notate  $F_B$ ) care conțin numai mediul de testare și inoculul; trebuie adăugate, de asemenea, orice substanțe chimice, solvenți, agenți sau filtre din fibră de sticlă utilizate pentru a introduce substanța chimică testată în vasele de testare;
  - (c) vase pentru procedura de verificare (notate  $F_C$ ), care conțin substanța chimică de referință;
  - (d) dacă este necesar, vase pentru verificarea posibilului efect inhibitor al substanței chimice testate (notate  $F_I$ ), care conțin atât substanța chimică testată, cât și substanța chimică de referință, la aceleași concentrații (punctul 24) cu cele din vasele  $F_T$  și  $F_C$ ;
  - (e) vase pentru verificarea unei posibile degradări abiotice (notate  $F_S$ ), care sunt vasele de la litera (a) în care se adaugă 50 mg/l  $HgCl_2$  sau sunt sterilizate prin alte metode (de exemplu, prin autoclavare).
43. Substanțele chimice testate solubile în apă și substanțele chimice de referință se adaugă la soluțiile stoc apoase (punctele 22, 23 și 24) pentru a obține o concentrație de 10-20 mg C/l.
44. Substanțele chimice testate insolubile și substanțele chimice de referință insolubile se adaugă în flacoane prin diferite metode [a se vedea punctul 22 literele (a)-(e)], în funcție de natura substanței chimice testate, fie înainte, fie după adăugarea mediului inoculat, în funcție de metoda de tratare a substanței chimice testate. Dacă se utilizează una dintre procedurile prezentate la punctul 22 literele (a)-(e), atunci flacoanele cu probă martor  $F_B$  [punctul 42 litera (b)] ar trebui tratate într-un mod similar, excluzându-se însă substanța chimică testată sau substanța chimică de referință.
45. Substanțele chimice testate volatile ar trebui injectate în flacoane închise ermetic (punctul 47) folosind o microseringă. Doza se calculează în funcție de volumul injectat și de densitatea substanței chimice testate.
46. În vase ar trebui adăugată apă, dacă este necesar, pentru a obține același volum de lichid în fiecare vas. Trebuie să se asigure că raportul spațiu liber-lichid (de obicei 1:2) și concentrațiile substanței chimice testate sunt astfel încât în spațiul liber se află suficient oxigen pentru a permite biodegradarea completă.

▼ **M4**

47. Apoi toate flacoanele se închid ermetic, de exemplu, cu membrană de cauciuc butilic și capace de aluminiu. În acest stadiu ar trebui adăugate substanțele chimice testate volatile (punctul 45). Dacă urmează a fi monitorizată scăderea concentrației COD a soluției experimentale și dacă urmează a se efectua analize ale concentrației inițiale de CA la momentul zero [etaloane sterile, punctul 42 litera (e)] sau ale alor parametri, se prelevează o probă adecvată din vasul de testare. Vasul de testare și conținutul acestuia sunt apoi eliminate.
48. Flacoanele închise ermetic se pun într-un agitator rotativ [punctul 15 litera (d)], cu o viteză de agitare suficientă pentru a menține conținutul flaconului bine amestecat și în suspensie (de exemplu, 150-200 rpm) și se incubează la întuneric, la 20 °C, pentru a se menține o variație de  $\pm 1$  °C.

*Prelevarea de probe*

49. Tipul de prelevare va depinde de perioada de latență și de cinetica biodegradării substanței chimice testate. Flacoanele se scot definitiv pentru analiză în ziua prelevării probei, ceea ce ar trebui să se producă săptămânal sau mai des (de exemplu, de două ori pe săptămână) dacă se cere o curbă de degradare completă. Din agitator se scoate numărul cerut de flacoane duplicate, acestea fiind  $F_T$ ,  $F_B$  și  $F_C$  și, dacă au fost folosite,  $F_I$  și  $F_S$  (a se vedea punctul 42). Testul durează de obicei 28 de zile. În cazul în care curba de biodegradare indică faptul că a fost atins un platou înainte de 28 de zile, testul poate fi încheiat înainte de 28 de zile. Se prelevează probe din cele cinci flacoane rezervate analizei în ziua 28 a testului, iar rezultatele se utilizează pentru calcularea limitelor de încredere sau a coeficientului de variație a procentului de biodegradare. Din flacoanele destinate verificărilor inhibării și degradării abiotice nu trebuie prelevate probe atât de des ca în cazul celorlalte vase; ar fi suficiente prelevări în ziua 1 și în ziua 28.

*Analiza carbonului anorganic (CA)*

50. Generarea de  $\text{CO}_2$  în flacoane se determină prin măsurarea creșterii concentrației de carbon anorganic (CA) în timpul incubării. Sunt disponibile două metode recomandate pentru măsurarea cantității de CA generat în cadrul testului, iar acestea sunt descrise mai jos. Deoarece metodele pot genera rezultate ușor diferite, se recomandă utilizarea unei singure metode în timpul unui test.
51. Metoda (a) este recomandată dacă este probabil ca mediul să conțină, de exemplu, resturi de hârtie de la filtrul de sticlă și/sau de substanță chimică testată insolubilă. Această analiză poate fi realizată folosind un cromatograf în fază gazoasă, dacă nu este disponibil un analizor de carbon. Este important ca, atunci când se analizează gazul din spațiul liber, flacoanele să fie la temperatura de testare sau la o temperatură apropiată de aceasta. Metoda (b) se poate dovedi mai ușor de folosit în laboratoarele care măsoară CA folosind analizoare de carbon. Este important ca soluția de hidroxid de sodiu (punctul 21) folosită pentru a transforma  $\text{CO}_2$  în carbonat să fie preparată proaspăt sau conținutul de CA al acesteia să fie cunoscut, astfel încât acesta să poată fi avut în vedere la calcularea rezultatelor testului [a se vedea punctul 66 litera (b)].

*Metoda (a): acidificarea la  $\text{pH} < 3$* 

52. Înaintea fiecărei serii de analize, analizorul de CA se calibrează folosind un standard pentru CA adecvat (de exemplu, 1 % g/g  $\text{CO}_2$  în  $\text{N}_2$ ). Acidul fosforic (punctul 20) se injectează prin dopul fiecărui flacon din care se prelevează probe pentru a reduce pH-ul mediului la  $< 3$  (de exemplu, se adaugă 1 ml la 107 ml mediu de testare). Flacoanele sunt puse înapoi în agitator. După agitare timp de o oră la temperatura de testare, flacoanele sunt scoase din agitator, sunt extrase alicote de gaz (de exemplu, 1 ml) din spațiul liber al fiecărui flacon și sunt injectate în analizorul de CA. Concentrațiile de CA măsurate sunt înregistrate în mg C/l.



▼ **M4**

53. Această metodă are la bază principiul conform căruia, după acidificarea la  $\text{pH} < 3$  și echilibrarea la  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , constanta de echilibru pentru distribuția  $\text{CO}_2$  între fazele lichidă și gazoasă din flacoanele de testare este 1,0 când se măsoară sub forma concentrației (13). Această relație ar trebui demonstrată pentru sistemul de testare cel puțin o dată după cum urmează:

Se pregătesc flacoane care conțin 5 și 10 mg/l de CA folosind o soluție de carbonat de sodiu anhidru ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) în apă fără  $\text{CO}_2$  preparată prin acidificarea apei la  $\text{pH}$  6,5 cu acid fosforic concentrat (punctul 20), barbotarea peste noapte cu apă fără  $\text{CO}_2$  și aducerea  $\text{pH}$ -ului la valoarea neutră cu o substanță alcalină. Se asigură că raportul dintre volumul spațiului liber și volumul lichidului este același cu cel din cadrul testelor (de exemplu, 1:2). Se acidifică și se echilibrează conform descrierii de la punctul 52 și se măsoară concentrațiile de CA atât în faza din spațiul liber, cât și în faza lichidă. Se verifică faptul că cele două concentrații sunt identice, în intervalul de eroare experimentală. Dacă nu este așa, operatorul ar trebui să reexamineze procedurile. Această verificare a distribuției CA între fazele lichidă și gazoasă nu trebuie realizată ori de câte ori se efectuează un test; aceasta ar putea fi realizată în timpul efectuării calibrării.

54. Dacă urmează a se măsura eliminarea COD (numai pentru substanțe chimice testate solubile în apă), ar trebui să se ia probe din faza lichidă din flacoane separate (neacidificate), filtrate prin membrană și injectate în analizorul de COD. Aceste flacoane pot fi folosite pentru alte analize, dacă este necesar, pentru a măsura biodegradarea primară.

*Metoda (b): transformarea  $\text{CO}_2$  în carbonat*

55. Înainte de analizarea fiecărei serii, analizorul de CA se calibrează folosind un standard adecvat – de exemplu, o soluție de bicarbonat de sodiu ( $\text{NaHCO}_3$ ) în apă fără  $\text{CO}_2$  (a se vedea punctul 53) în intervalul 0-20 mg/l CA. Soluția de hidroxid de sodiu (7M, punctul 21) (de exemplu, 1 ml la 107 ml de mediu) se injectează prin dopul fiecărui flacon folosit pentru prelevare, iar flacoanele sunt agitate timp de 1 h la temperatura de testare. Se folosește aceeași soluție de NaOH în toate flacoanele scoase definitiv într-o anumită zi, însă nu este necesar pentru toate prelevările de probe realizate pe parcursul unui test. Dacă se cer valorile CA absolute ale probei maror la fiecare prelevare de probe, va fi necesară determinarea CA din soluția de NaOH de fiecare dată când aceasta este folosită. Flacoanele sunt scoase din agitator și sunt lăsate să decanteze. Sunt prelevate volume adecvate (de exemplu, 50-1 000  $\mu\text{l}$ ) din faza lichidă din fiecare vas cu ajutorul unei seringi. Probele sunt injectate în analizorul de CA și sunt înregistrate concentrațiile de CA. Ar trebui să se asigure faptul că analizorul utilizat este dotat corespunzător pentru a trata probele alcaline produse prin această metodă.
56. Această metodă are la bază principiul conform căruia, după adăugarea de produs alcalin și agitare, concentrația de CA în spațiul liber este neglijabilă. Această relație ar trebui verificată pentru sistemul testat cel puțin o dată folosind standarde pentru CA, adăugând produse alcaline și echilibrând și măsurând concentrația de CA atât în faza din spațiul liber, cât și în faza lichidă (a se vedea punctul 53). Concentrația în spațiul liber ar trebui să fie apropiată de zero. Această verificare a absorbției practice complete a  $\text{CO}_2$  nu trebuie realizată de fiecare dată când se efectuează testul.
57. Dacă urmează a se măsura eliminarea COD (numai pentru substanțe chimice testate solubile în apă), ar trebui prelevate probe din faza lichidă din flacoane separate (care nu conțin produs alcalin), filtrate prin membrană și injectate în analizorul de COD. Aceste flacoane pot fi folosite pentru alte analize, dacă este necesar, pentru a măsura biodegradabilitatea primară.

**▼ M4****DATE ȘI RAPORT****Calcularea rezultatelor**

58. Presupunând că substanța chimică testată este mineralizată 100 % la CO<sub>2</sub>, CATH care o depășește pe cea generată în flaconul cu probă martor este egală cu COT adăugată în fiecare flacon de testare la începutul testului, adică:

$$\text{CATH} = \text{COT}$$

Masa totală (mg) de carbon anorganic (CAT) din fiecare flacon este:

$$\begin{aligned} \text{TIC} &= (\text{mg C din lichid} + \text{mg C din spațiul liber}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \quad \text{Ecuația [1]}$$

unde:

$V_L$  = volumul de lichid din vas (litri);

$C_L$  = concentrația de CA în lichid (carbon în mg/l);

$V_H$  = volumul spațiului liber (litri);

$C_H$  = concentrația de CA în spațiul liber (carbon în mg/l).

Calculule CAT prin cele două metode analitice folosite pentru măsurarea CA în acest test sunt descrise mai jos la punctele 60 și 61. Procentul de biodegradare (% D) din fiecare caz este dat de:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Ecuația [2]}$$

unde:

$\text{CAT}_t$  = mg CAT din flaconul de testare la momentul t

$\text{CAT}_b$  = mg CAT din flacoanele cu probă martor la momentul t

$\text{COT}$  = mg COT adăugate inițial în flaconul de testare

Procentul de biodegradare % D se calculează pentru flacoanele de testare ( $F_T$ ), de referință ( $F_C$ ) și, dacă este inclus, de verificare a monitorizării efectului inhibitor ( $F_I$ ) în funcție de cantitățile respective de CAT generate până la momentul fiecărei prelevări de probe.

59. Dacă s-a produs o creștere semnificativă a conținutului de CAT în etalonul steril ( $F_S$ ) în timpul testului, atunci se poate concluziona că a avut loc degradarea abiotică a substanței chimice testate și trebuie să se țină cont de aceasta la calcularea D din ecuația [2].

**Acidificare la pH < 3**

60. Deoarece acidificarea la pH < 3 și echilibrarea au ca rezultat egalizarea concentrației de CAT în fazele lichidă și gazoasă, trebuie măsurată numai concentrația de CA din faza gazoasă. Astfel, din Ecuația [1]  $\text{CAT} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$ , unde  $V_B$  = volumul flaconului serologic.

**Transformarea CO<sub>2</sub> în carbonat**

61. În această metodă calculele se efectuează la fel ca în ecuația [1], însă cantitatea neglijabilă de CA din faza gazoasă este ignorată, adică  $V_H \times C_H = 0$  și  $\text{CAT} = V_L \times C_L$ .

▼ **M4****Exprimarea rezultatelor**

62. Prin unirea procentelor de biodegradare se obține o curbă de biodegradare,  $D$ , în funcție de timpul de incubare, iar aceasta va indica, dacă este posibil, faza de latență, faza de biodegradare, fereastra de 10 zile și faza de platou, care este faza în care s-a atins degradarea maximă și curba de biodegradare este nivelată. Dacă au fost obținute rezultate comparabile pentru vasele de testare paralele  $F_T$  (diferență  $< 20 \%$ ), se trasează o curbă medie (a se vedea apendicele 2, figura 1); în caz contrar, se trasează curbe pentru fiecare vas. Se determină valoarea medie a procentului de biodegradare în faza de platou sau se evaluează valoarea cea mai mare a acesteia (de exemplu, când curba descrește în faza de platou), este important însă să se estimeze că, în acest din urmă caz, valoarea nu este divergentă. Acest nivel maxim al biodegradării este indicat în raportul testului ca „grad de biodegradare al substanței chimice testate”. Dacă numărul de vase de testare a fost insuficient pentru indicarea fazei de platou, datele măsurate din ultima zi a testului sunt folosite pentru calcularea unei valori medii. Această valoare finală, media a cinci teste duplicat, servește la indicarea preciziei cu care a fost determinat procentul de biodegradare. Se raportează, de asemenea, valoarea obținută la finalul ferestrei de 10 zile.
63. În același mod, se trasează o curbă pentru substanța chimică de referință  $F_C$  și, dacă acestea sunt incluse, pentru verificarea degradării abiotice  $F_S$  și pentru verificarea efectului inhibitor  $F_I$ .
64. Cantitățile de CAT prezente în probele martor ( $F_B$ ) sunt înregistrate la fel cum sunt înregistrate și cele din flacoanele  $F_S$  (verificare abiotică), dacă aceste vase au fost incluse în test.
65. Se calculează  $D$  pentru vasele  $F_I$ , pe baza unui randament teoretic preconizat pentru CA numai din componentul de referință al amestecului. Dacă, în ziua 28,  $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25 \%$ , se poate presupune că substanța chimică testată a inhibat activitatea inoculului, iar acest fapt poate fi responsabil pentru valorile mici obținute pentru  $D_{FT}$  în condițiile de testare. În acest caz, testul poate fi repetat folosind o concentrație mai mică a substanței testate și, de preferat, cu reducerea CID din inocul și a CAT format în probele martor, întrucât concentrația mai scăzută va reduce precizia metodei. Ca alternativă, poate fi utilizat un alt inocul. Dacă în flaconul  $F_S$  (abiotic) se observă o creștere semnificativă ( $> 10 \%$ ) a cantității de CAT, este posibil ca procesele de degradare abiotică să fi avut loc.

**Validarea rezultatelor**

66. Un test se consideră a fi valid dacă:
- (a) procentul mediu de degradare din vasele  $F_C$  care conțin substanța chimică de referință este  $> 60 \%$  în ziua 14 a incubării; și
  - (b) cantitatea medie de CAT prezentă în probele martor  $F_B$  la finalul testului este  $> 3 \text{ mg C/l}$ .

Dacă aceste limite nu sunt satisfăcute, testul ar trebui să se repete cu un inocul din altă sursă și/sau procedurile folosite ar trebui revizuite. De exemplu, dacă generarea mare de CA din probele martor reprezintă o problemă, ar trebui urmărite procedurile prezentate la punctele 27-32.

<sup>(1)</sup> Procentul de degradare din vasele  $F_C$  care conțin substanța de referință.

<sup>(2)</sup> Procentul de degradare din vasele  $F_I$ .

**▼ M4**

67. Dacă substanța chimică testată nu atinge 60 % CATH și s-a dovedit că nu are efect inhibitor (punctul 65), testul ar putea fi repetat cu o concentrație mai mare de inocul (până la 30 mg/l nămol activ și 100 ml efluent/l) sau cu inocul din alte surse, în special dacă degradarea s-a situat în intervalul 20-60 %.

**Interpretarea rezultatelor**

68. Biodegradarea CATH > 60 % în intervalul ferestrei de 10 zile din acest test demonstrează că substanța chimică testată este ușor biodegradabilă în condiții aerobe.
69. Dacă valoarea de prag de 60 % a CATH nu a fost atinsă, se determină valoarea pH-ului mediului din flacoanele care nu au fost acidificate sau alcalinizate; o valoare mai mică de 6,5 ar putea indica faptul că s-a produs nitrificarea. În acest caz, se repetă testul cu o soluție tampon cu o concentrație mai mare.

**Raportul de testare**

70. Se întocmește un tabel cu % D pentru fiecare flacon de testare ( $F_T$ ), de referință ( $F_C$ ) și, dacă este inclus, pentru flaconul de verificare a efectului inhibitor ( $F_I$ ), pentru fiecare dintre zilele în care s-au prelevat probe. Dacă s-au obținut rezultate comparabile pentru flacoane duplicate, se trasează o curbă a % D medie în funcție de timp. Se înregistrează cantitatea de CAT în probele martor ( $F_B$ ) și în etaloanele sterile ( $F_S$ ), COD și/sau alți parametri, precum și procentajul de eliminare al acestora.
71. Se determină valoarea medie a % D din faza de platou sau se folosește valoarea cea mai mare în cazul în care curba de biodegradare descreește în faza de platou, iar această valoare se raportează ca „grad de biodegradare al substanței chimice testate”. În acest din urmă caz, este important să se asigure că valoarea nu este divergentă.
72. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică testată:*

- denumire comună, denumire chimică, număr CAS, formulă structurală și proprietăți fizico-chimice relevante;
- puritatea (impuritățile) substanței chimice testate.

*Condițiile de testare:*

- trimiterea la prezenta metodă de testare;
- descrierea sistemului de testare utilizat (de exemplu, volumul vasului, raportul spațiu liber/lichid, metoda de amestecare etc.);
- adăugarea substanței chimice testate în sistemul de testare: concentrația substanței testate și cantitatea de carbon dozată în fiecare flacon de testare și orice utilizare a solvenților;
- detalii privind inoculul utilizat, orice pretratare și preconditionare;
- temperatura de incubare;
- validarea principiului analizei CA;
- principalele caracteristici ale analizorului de CA utilizat (și ale oricăror ale metode analitice utilizate);
- numărul de flacoane duplicate.

*Rezultatele:*

- datele primare și valorile calculate ale biodegradabilității în formă tabelară;

**▼M4**

- graficul degradării procentuale în funcție de timp pentru substanța chimică testată și pentru substanța chimică de referință, faza de latență, faza de degradare, fereastra de 10 zile și panta;
- procentul de eliminare la platou, la finalul testului și după fereastra de 10 zile;
- motivele de respingere a rezultatelor testului;
- orice alte fapte relevante pentru procedura urmată;
- discutarea rezultatelor.

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» – Test de degajare a CO<sub>2</sub> (Metoda C.4-C)”.
- (2) Sturm R.N. (1973), Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation, J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.
- (3) Larson R.J. (1979), Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.
- (4) Larson R.J., Hansmann M.A. și Bookland E.A. (1996), Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; revizuit în 1999), Calitatea apei – Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Testul degajării dioxidului de carbon (Sturm).
- (6) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill W.E. (1975), Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate, Appl Microbiol. 30: 922-929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994), The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability, Chemosphere 28: 801-812.
- (10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975), A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides, J. Food Sci. 40: 181-185.
- (11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzocchi P.H. and Bailey P.H. (1978), Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.
- (12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986), A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.
- (13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990), Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test, Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.
- (14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991), The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability, Chemosphere 23: 507-524.
- (15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989), Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, Chemosphere 19: 1527-1550.

▼ **M4**

- (16) ISO 14593 (1999), Calitatea apei – Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetice (Încercare cu CO<sub>2</sub> în spațiul superior).
- (17) Battersby N.S. (1997), The ISO headspace CO<sub>2</sub> biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996), Fate, Transport and Transportation. 835,3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999), An „inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test, Chemosphere 38: 3219-3235.
- (20) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» ”.
- (21) OCDE (1988), OCDE Metode de testare comparate interlaboratoare pentru determinarea biodegradabilității rapide: Raportul președintelui (M. Hashimoto; MITI) și raportul final (M. Kitano și M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Capitolul C.11 din prezenta anexă, „Nămolul activ: test de inhibiție a respirației”.
- (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995), A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests, Biodegradation 6: 319-327.
- (24) UE (1999), Ring-test of the ISO Headspace CO<sub>2</sub> method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996), Calitatea apei. Ghid pentru pregătirea și tratarea compușilor organici greu solubili în apă în vederea evaluării biodegradabilității lor în mediu apos.

**▼ M4***Apendicele 1***ABREVIERI ȘI DEFINIȚII**

**CA:** carbon anorganic.

**CO<sub>2</sub>T:** cantitatea teoretică de dioxid de carbon (mg) este cantitatea de dioxid de carbon calculată din conținutul de carbon cunoscut sau măsurat al substanței chimice testate când aceasta este complet mineralizată; se exprimă și ca mg dioxid de carbon degajat pe mg substanță chimică testată.

**COD:** carbonul organic dizolvat este carbonul organic prezent în soluție sau acela care trece printr-un filtru de 0,45 microni sau rămâne în supernatant după centrifugare la aproximativ 4 000 g (aproximativ 40 000 m s<sup>-2</sup>) timp de 15 min.

**CAD:** carbon anorganic dizolvat.

**CAT<sub>h</sub>:** carbon anorganic teoretic.

**CAT:** carbon anorganic total.

**Ușor biodegradabil:** o clasificare arbitrară a substanțelor chimice care au trecut anumite teste de screening specificate pentru biodegradabilitatea finală; aceste teste sunt atât de riguroase încât se admite că asemenea substanțe chimice se vor degrada biologic rapid și complet în medii acvatice în condiții aerobe.

**Fereastră de 10 zile:** cele 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % biodegradare.

**Biodegradabilitate intrinsecă:** o clasificare a substanțelor chimice pentru care există probe neechivoce de biodegradare (primară sau finală) în orice test de biodegradabilitate.

**Biodegradare aerobă finală:** nivelul de degradare realizat când substanța chimică testată este complet folosită de microorganisme având ca rezultat producerea de dioxid de carbon, apă, săruri minerale și noi constituenți celulari microbieni (biomasă).

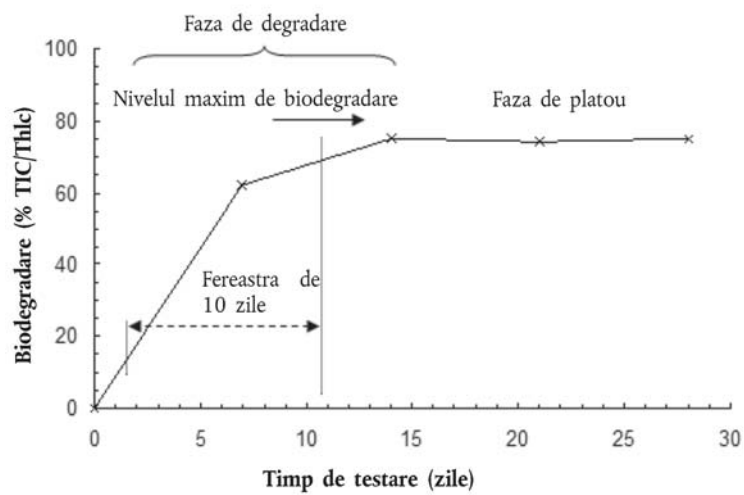
**Mineralizare:** mineralizarea reprezintă degradarea completă a unei substanțe chimice organice în CO<sub>2</sub> și H<sub>2</sub>O în condiții aerobe și în CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> și H<sub>2</sub>O în condiții anaerobe.

**Fază de latență:** perioada cuprinsă între începutul unui test și momentul în care se realizează aclimatizarea și/sau adaptarea microorganismelor care produc degradarea, iar gradul de biodegradare al unei substanțe chimice testate sau al materiilor organice a crescut la un nivel detectabil (de exemplu, 10 % din biodegradarea teoretică maximă sau mai puțin, în funcție de precizia metodei de măsurare).

**Faza de degradare:** timpul de la sfârșitul perioadei de latență până în momentul în care se atinge 90 % din nivelul maxim de degradare.

**Faza de platou:** faza de platou este faza în care s-a atins degradarea maximă, iar curba de biodegradare s-a aplatizat.

**Substanță chimică testată:** orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼ **M4***Apendicele 2***Exemplu de curbă de biodegradare***Figura 1***Biodegradarea 1-octanolului în testul CO<sub>2</sub> în spațiul liber***Glosar*

Biodegradare

Faza de degradare

Nivelul maxim de biodegradare

Faza de platou

Fereastra de 10 zile

Timp de testare (zile)



▼ **M4****C. 30. BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE TERESTRE****INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 317 (2010). Printre metodele de testare în legătură cu evoluția în mediu, „Bioconcentrarea: experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor” [capitolul C.13 din prezenta anexă (49)] și „Bioacumularea în oligochetele bentice care trăiesc în sedimente” (53) au fost publicate în anii 1996 și respectiv 2008. Este dificil, dacă nu imposibil, ca datele privind bioacumularea acvatică să fie extrapolate la organismele terestre, cum sunt râmile. În prezent, sunt utilizate modele de calcul bazate pe un test al caracterului lipofil al unei substanțe chimice, de exemplu, (14) (37), pentru evaluarea bioacumulării de substanțe chimice în sol, cum este de exemplu, Ghidul tehnic al UE (19). Necesitatea unei metode de testare care să includă compartimente specifice a fost deja prezentată, de exemplu în (55). O astfel de metodă este importantă, mai ales pentru evaluarea otrăvirii secundare în lanțurile alimentare terestre (4). Mai multe metode de testare naționale abordează problema bioacumulării în alte organisme în afară de pești, de exemplu (2) și (72). O metodă de măsurare a bioacumulării din solurile contaminate în râme (*Eisenia fetida*, Savigny) și în enchitreide a fost dezvoltată de American Society for Testing and Materials (Societatea Americană pentru Testări și Materiale) (3). O metodă acceptată pe plan internațional pentru determinarea bioacumulării în solul îmbogățit va îmbunătăți evaluarea riscurilor substanțelor chimice asupra ecosistemelor terestre, de exemplu (25) (29).
2. Nevertebratele geofage sunt expuse la substanțele chimice prezente în sol. Printre aceste animale, oligochetele terestre joacă un rol important în structura și funcția solurilor (15) (20). Oligochetele terestre trăiesc în sol și, parțial, la suprafața acestuia (în special în litieră); acestea reprezintă în mod frecvent specia cea mai abundentă din punct de vedere al biomasei (54). Prin rolul lor în bioturbarea solului și ca pradă, aceste animale pot avea o influență puternică asupra biodisponibilității substanțelor chimice pentru organisme prădătoare, precum nevertebratele [de exemplu, acarienii prădători și coleoptere; de exemplu (64)] sau vertebratele (de exemplu, vulpi și pescăruși) (18) (62). Unele specii de oligochete terestre folosite în prezent în cadrul testelor ecotoxicologice sunt descrise în apendicele 5.
3. Ghidul ASTM privind efectuarea testelor de laborator pentru toxicitatea solului sau bioacumularea cu râme *Eisenia fetida* și enchitreide *Enchytraeus albidus* (3) furnizează multe detalii esențiale și utile pentru realizarea metodei de testare curente privind bioacumularea în sol. Documentația suplimentară la care se face trimitere în prezenta metodă de testare sunt disponibile în capitolul C.13 din prezenta anexă, Bioconcentrarea: experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor (49) și în orientarea nr. 315 a OCDE: Bioacumularea în oligochetele bentice care trăiesc în sedimente (53). Experiența practică obținută din studiile privind bioacumularea în sol și din diversele publicații ale literaturii de specialitate, de exemplu, (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) reprezintă, de asemenea, surse importante de informații pentru această metodă de testare.
4. Prezenta metodă de testare se aplică în general substanțelor chimice organice, neutre, stabile care tind să se adsorbă în soluri. Prezenta metodă de testare poate permite testarea bioacumulării compușilor organo-metalici stabili prezenți în sol. De asemenea, aceasta este aplicabilă metalelor și altor microelemente.

**PREMISE**

5. Testele pentru măsurarea bioacumulării unei substanțe chimice în oligochetele terestre au fost efectuate cu metale grele [a se vedea, de exemplu, (63)] și cu substanțe chimice organice persistente care aveau valorile log  $K_{ow}$  cuprinse între 3,0 și 6,0, de exemplu (40). Aceste teste se aplică, de asemenea, la:

— substanțe chimice care prezintă un log  $K_{ow}$  mai mare de 6,0 (substanțe chimice super-hidrofobe);

▼ **M4**

- substanțe chimice care aparțin clasei de substanțe chimice organice cunoscute a avea potențial de bioacumulare în organisme vii, de exemplu substanțe chimice tensioactive sau foarte adsorbante;
  - substanțe chimice al căror potențial de bioacumulare este indicat de caracteristicile structurale, de exemplu analogi ai substanțelor chimice cu potențial de bioacumulare cunoscut; și
  - metale.
6. Înainte de inițierea studiului ar trebui obținute informații privind substanțele chimice testate, cum sunt denumirea comună, denumirea chimică (de preferat denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea, măsurile de securitate, condițiile adecvate de păstrare și metodele analitice. În plus, trebuie cunoscute următoarele informații:
- (a) solubilitatea în apă;
  - (b) coeficientul de partiție octanol-apă,  $K_{ow}$ ;
  - (c) coeficientul de partiție sol-apă, exprimat prin  $K_{oc}$ ;
  - (d) presiunea de vapori;
  - (e) degradabilitatea (de exemplu, în sol, apă);
  - (f) metaboliții cunoscuți.
7. Pot fi utilizate substanțe chimice de testare marcate radioactiv sau nemarcate radioactiv. Totuși, pentru a ușura analiza, se recomandă utilizarea unei substanțe chimice testate marcată radioactiv. Decizia se va lua în funcție de limitele de detectare sau de necesitatea de măsurare a substanței chimice testate de origine și a metaboliților. Dacă se utilizează o substanță chimică de testat marcată radioactiv și dacă sunt măsurate reziduurile radioactive totale, este important ca reziduurile marcate radioactiv, atât din sol, cât și din organismele testate, să fie definite în procente de substanță chimică testată de origine și de substanță chimică marcată ca nefiind de origine, de exemplu în probe prelevate la starea de echilibru sau la finalul fazei de absorbție, pentru a permite calcularea unui factor de bioacumulare (BAF) pentru substanța chimică testată de origine și pentru metaboliții din sol care prezintă interes (a se vedea punctul 50). S-ar putea dovedi necesară modificarea metodei descrise aici, de exemplu pentru a furniza suficientă biomasă pentru măsurarea substanțelor chimice testate organice sau a metalelor nemarcate radioactiv. Când sunt măsurate reziduurile radioactive totale (prin numărătoarea în scintilație lichidă după extracția, arderea sau solubilizarea țesutului), factorul de bioacumulare se bazează pe substanța chimică testată de origine și pe metaboliți. Calcularea BAF ar trebui să se bazeze, de preferat, pe concentrația substanței chimice testate de origine din organism și pe reziduurile radioactive totale. Ulterior, factorul de acumulare biotă-sol (BSAF), ajustat cu conținutul de lipide al viermelui și cu conținutul de carbon organic (CO) al solului, ar trebui calculat din BAF din motive de asigurare a comparabilității între rezultatele obținute din diferite teste de bioacumulare.
8. Toxicitatea substanței chimice testate față de speciile utilizate în test ar trebui să fie cunoscută, de exemplu, o concentrație de efect (CE<sub>x</sub>) sau concentrația letală (CL<sub>x</sub>) pentru durata fazei de absorbție [de exemplu (19)]. Concentrația selectată a substanței chimice testate ar trebui să fie, de preferat, de aproximativ 1 % din CL<sub>50</sub> acută asimptotică și de cel puțin zece ori mai mare decât limita sa de detecție în sol prin metoda de analiză utilizată. Dacă sunt disponibile, ar trebui utilizate în mod preferențial valorile de toxicitate determinate din studiile de lungă durată privind efectele subletale (51) (52). Dacă aceste date nu sunt disponibile, un test privind toxicitatea acută va furniza informații utile [a se vedea, de exemplu, (23)].

## ▼ M4

9. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică potrivită pentru care se cunosc exactitatea, fidelitatea și sensibilitatea în vederea cuantificării substanței chimice din soluțiile experimentale, din sol și din materialul biologic, împreună cu detalii privind prepararea și păstrarea probelor, precum și cu fișe tehnice de securitate. De asemenea, trebuie cunoscută limita de detecție analitică a substanței testate din sol și din țesutul viermelui. Dacă se utilizează o substanță chimică testată marcată cu  $C^{14}$ , trebuie să fie cunoscute radioactivitatea specifică (de exemplu  $Bq\ mol^{-1}$ ) și procentul radioactivității asociate impurităților. Radioactivitatea specifică a substanței chimice testate trebuie să fie suficient de mare pentru a facilita analiza, iar concentrațiile substanței testate nu trebuie să producă efecte toxice.
10. Testul poate fi realizat cu un sol artificial sau cu soluri naturale. Înainte de inițierea testului ar trebui cunoscute informațiile privind caracteristicile solului natural utilizat, de exemplu originea solului sau constituenții acestuia, pH-ul, conținutul de carbon organic, granulometria (procent de nisip, aluviuni și argilă) și capacitatea de reținere a apei (CRA), (3) (48).

## PRINCIPIUL TESTULUI

11. Parametrii care caracterizează bioacumularea unei substanțe chimice testate includ factorul de bioacumulare (BAF), constanta vitezei de absorbție ( $k_s$ ) și constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ). Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.
12. Testul constă în două faze: faza de absorbție (expunere) și faza de eliminare (post-expunere). În timpul fazei de absorbție, grupuri replicate de viermi sunt expuse la solul care a fost îmbogățit cu substanța chimică testată. Pe lângă animalele testate, grupuri martor de viermi sunt ținute în condiții identice fără substanța chimică testată. Se măsoară greutatea uscată și conținutul de lipide ale organismelor testate. Aceasta se poate realiza folosind viermi din grupul martor. Valorile analitice de bază (martor) pot fi obținute prin analizarea probelor martor de viermi și de sol. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sol fără substanța chimică testată. O fază de eliminare este necesară întotdeauna, exceptând cazul în care absorbția substanței chimice testate în timpul fazei de expunere a fost nesemnificativă. O fază de eliminare furnizează informații privind viteza cu care substanța chimică testată este excretată de organismele testate [de exemplu (27)]. Dacă în timpul fazei de absorbție nu se atinge o stare de echilibru, este de preferat ca determinarea parametrilor cinetici – factorul de bioacumulare cinetic  $BAF_K$ , constanta (constantele) vitezei de absorbție și de eliminare – să se bazeze pe ajustarea simultană a rezultatelor fazelor de absorbție și de eliminare. Concentrația substanței chimice testate din/de pe viermi se monitorizează pe parcursul ambelor faze ale testului.
13. În timpul fazei de absorbție, măsurătorile se realizează la intervale de prelevare de până la 14 zile (la enchitreide) sau de 21 de zile (la râme) până când se atinge starea de echilibru (11) (12) (67). Starea de echilibru apare atunci când un grafic al concentrației din viermi în funcție de timp este paralel cu axa timpului, iar analizele a trei concentrații succesive realizate pe probe prelevate la intervale de cel puțin două zile nu variază cu mai mult de  $\pm 20\%$  una față de cealaltă, pe baza comparațiilor statistice (de exemplu, analiza varianței, analiza regresiei).
14. Faza de eliminare constă în transferul organismelor testate în vase care conțin același substrat fără substanța chimică testată. În timpul fazei de eliminare, măsurătorile se realizează la intervale de prelevare de până la 14 zile (la enchitreide) sau de 21 de zile (la râme), exceptând cazul în care o determinare analitică anterioară a indicat o reducere cu 90 % a reziduurilor substanței chimice testate în viermi. Concentrația substanței chimice testate din viermi la finalul fazei de eliminare se raportează ca reziduuri neeliminate. Factorul de bioacumulare al stării de echilibru ( $BAF_{ss}$ ) se calculează, de preferință, atât ca raport între concentrația din viermi ( $C_a$ ) și cea din sol ( $C_s$ ) la starea de echilibru aparentă, cât și ca factor de bioacumulare cinetic,

▼ **M4**

$BAF_K$ , ca raport între constanta vitezei de absorbție din sol ( $k_s$ ) și constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ) (a se vedea apendicele 1 pentru definiții) presupunând o cinetică de ordinul întâi (a se vedea apendicele 2 pentru calcule). În cazul în care cinetica de ordinul întâi este clar inaplicabilă, trebuie utilizate alte modele.

15. Constanta vitezei de absorbție, constanta vitezei de eliminare (sau constantele, în cazul în care sunt implicate alte modele), factorul de bioacumulare cinetic ( $BAF_K$ ) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri, se calculează plecând de la ecuații de modelare informatice (a se vedea apendicele 2 pentru orientare). Calitatea ajustării oricărui model poate fi determinată, de exemplu, din coeficientul de corelare sau coeficientul de determinare (coeficienții apropiați de unu indică o bună calitate a ajustării) sau testul chi-pătrat. De asemenea, mărimea erorii standard sau limita de încredere în jurul parametrilor estimați poate fi un indicator al calității ajustării modelului.
16. Pentru a reduce variabilitatea rezultatelor testului pentru substanțe chimice testate cu caracter foarte lipofil, factorii de bioacumulare trebuie exprimați în raport cu conținutul lipidic și conținutul de carbon organic (kg carbon organic sol (CO) kg-1 conținut lipidic vierme). Aceasta abordare se bazează pe faptul că, pentru unele clase de substanțe chimice, există o relație clară între potențialul de bioacumulare și caracterul lipofil; această relație a fost bine stabilită pentru pești (47). Există o relație între conținutul de lipide al peștilor și bioacumularea unor astfel de substanțe chimice. Pentru organisme benthice au fost identificate corelări similare, de exemplu (30) (44). În mod similar, această corelare a fost demonstrată pentru oligochetele terestre, de exemplu (5) (6) (7) (14). Dacă este disponibil suficient țesut de vierme, conținutul de lipide al animalelor testate poate fi determinat pe același material biologic ca cel utilizat pentru determinarea concentrației de substanță chimică testată. Ca alternativă, pot fi utilizate animale martor pentru măsurarea conținutului de lipide.

## VALIDITATEA TESTULUI

17. Pentru ca un test să fie valid, următoarele criterii trebuie îndeplinite atât de grupurile martor cât și de cele de tratate:
  - la finalul testului, mortalitatea totală în cursul fazei de absorbție și a celei de eliminare nu trebuie să depășească 10 % (la râme) sau 20 % (la enchytreide) din numărul total al viermilor introduși;
  - pentru *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei*, pierderea masică medie măsurată la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare nu trebuie să depășească 20 % comparativ cu masa proaspătă inițială (m.p.) la începutul fiecărei faze.

## DESCRIEREA METODEI

**Speciile folosite pentru testare:**

18. Pentru testarea bioacumulării sunt recomandate mai multe specii de oligochete terestre. Speciiile cel mai frecvent folosite [*Eisenia fetida* sau *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*) sau *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* sau *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*)] sunt descrise în apendicele 5.

▼ **M4****Aparatură**

19. Se vor evita materialele care pot adsorbi, dizolva substanța chimică testată sau care pot lesiva alte substanțe chimice și care pot avea un efect indezirabil asupra animalelor testate, aceasta fiind valabilă pentru toate componentele echipamentelor folosite. Pot fi folosite vase standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material inert chimic și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare, adică cu numărul de viermi testați. Pentru orice echipamente care intră în contact cu mediul de testare poate fi folosit oțel inoxidabil, plastic sau sticlă. Vasele de testare trebuie acoperite în mod corespunzător pentru a preveni răspândirea viermilor, permițând totodată pătrunderea unei cantități suficiente de aer. Pentru substanțele chimice cu coeficienți mari de adsorbție, cum ar fi piretrinele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În aceste cazuri, echipamentul se va elimina după utilizare (49). Trebuie prevenită degajarea substanțelor testate marcate radioactiv și a substanțelor chimice volatile. Trebuie utilizate separatoare (de exemplu, flacoane din sticlă pentru spălare cu gaz) care să conțină substanțe absorbante adecvate pentru a reține orice reziduuri care se evaporă din vasele de testare.

**Sol**

20. Calitatea solului testat trebuie să permită supraviețuirea și, de preferat, reproducerea organismelor testate în perioada de aclimatizare și în cursul experimentului, fără apariția vreunui comportament anormal. Viermii trebuie introduși în sol.
21. Solul artificial descris la capitolul C.8 din prezenta anexă (48) este recomandat spre a fi utilizat ca substrat în teste. Prepararea solului artificial pentru a fi utilizat în testele de bioacumulare și recomandările privind păstrarea solului artificial sunt prezentate în apendicele 4. Solul artificial uscat cu aer poate fi păstrat la temperatura camerei până la utilizare.
22. Totuși, solurile naturale care provin din amplasamente nepoluate pot servi drept sol pentru testare/cultură. Solurile naturale trebuie să fie caracterizate cel puțin prin origine (locul de colectare), pH, conținut de carbon organic, granulometrie (procent de nisip, aluviuni și argilă), capacitatea maximă de reținere a apei (CRAmax) și conținutul procentual de apă (3). Analiza solului sau a constituenților acestuia, anterior utilizării, din punct de vedere al micropoluantilor ar trebui să furnizeze informații utile. În cazul în care se utilizează sol prelevat de pe terenuri agricole, acesta nu trebuie să fi fost tratat cu produse pentru protecția recoltei sau cu bălegar de la animale tratate ca fertilizatori, timp de cel puțin un an, și nici cu fertilizatori organici, timp de cel puțin șase luni înainte de prelevarea probelor (50). Procedurile de manipulare pentru solurile naturale anterior utilizării în teste ecotoxicologice de laborator cu oligochete sunt descrise în (3). Pentru solurile naturale, perioada de păstrare în laborator trebuie să fie cât mai scurtă cu putință.

**Aplicarea substanței chimice testate**

23. Substanța chimică testată se încorporează în sol. Trebuie să se țină cont de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate. O substanță chimică testată solubilă în apă trebuie să fie complet dizolvată în apă înainte de a fi amestecată cu solul. Procedura de îmbogățire recomandată pentru substanțele chimice testate cu solubilitate redusă în apă implică acoperirea unuia sau a mai multor constituenți ai solului (artificial) cu substanța chimică testată. De exemplu, nisip de cuarț sau o parte din acesta poate fi îmbibată cu o soluție de substanță chimică testată într-un solvent organic corespunzător, care este apoi evaporat lent până la uscare. Frațiunea acoperită poate fi apoi amestecată cu solul umed. Avantajul major al acestei proceduri este acela că în sol nu se introduce solvent. Când se utilizează un sol natural, substanța chimică testată poate fi adăugată prin

▼ **M4**

îmbogățirea unei părți de sol uscate cu aer, astfel cum este descris mai sus pentru solul artificial, sau prin amestecarea substanței chimice testate într-un sol umed, însoțită de un pas ulterior de evaporare dacă se utilizează un agent de solubilizare. În general, trebuie evitat, în măsura în care este posibil, contactul solului umed cu solvenți. Se au în vedere cele menționate în continuare (3):

- dacă se utilizează un alt solvent în afară de apă, acesta trebuie să fie unul miscibil în apă și/sau care poate fi eliminat (de exemplu, evaporat), lăsând în sol numai substanța chimică testată;
- dacă se utilizează un martor tratat cu solvent, nu sunt necesari martori negativi. Martorul tratat cu solvent trebuie să conțină cea mai mare concentrație de solvent adăugat în sol și ar trebui să utilizeze un solvent din același lot cu cel folosit pentru a prepara soluția stoc. Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței chimice testate în solventul ales ar trebui să reprezinte principalele criterii folosite pentru selecția unui agent de solubilizare adecvat.

24. Pentru substanțele chimice cu solubilitate redusă în apă și în solvenți organici, pot fi amestecate 2,0-2,5 g de nisip de cuarț fin măcinat pe vas de testare cu cantitatea de substanța chimică testată, de exemplu folosind un mojar și un pistil, pentru a obține concentrația dorită a substanței testate. Acest amestec de nisip de cuarț și substanță chimică testată se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine cu o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final se distribuie în vasele de testare. Procedura se repetă pentru fiecare concentrație a substanței testate, pregătindu-se, de asemenea, o probă martor adecvată cu 2,0-2,5 g de nisip de cuarț fin măcinat pe vas de testare.
25. Se determină concentrația substanței chimice testate în sol după îmbogățire. Înainte de introducerea organismelor testate trebuie verificată distribuirea omogenă a substanței chimice testate în sol. Metoda utilizată pentru îmbogățire și motivele pentru alegerea unei proceduri de îmbogățire specifice trebuie raportate (24).
26. În mod ideal, ar trebui realizat un echilibru între sol și apa interstițială înainte de adăugarea organismelor; se recomandă o perioadă de timp de patru zile la 20 °C. Pentru multe substanțe chimice organice cu solubilitate scăzută în apă timpul necesar pentru a se atinge un echilibru real între fracțiile adsorbită și dizolvată poate fi de ordinul zilelor sau al lunilor. În funcție de scopul studiului, de exemplu atunci când urmează a fi simulate condițiile de mediu, îmbogățirea solului poate fi „învechită” pentru o perioadă mai îndelungată, de exemplu, pentru metale, trei săptămâni la 20 °C (22).

#### **Creșterea organismelor testate**

27. Viermii ar trebui, de preferat, ținuti în cultură de laborator permanentă. Ghidul privind metodele culturilor de laborator pentru speciile *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* și *Enchytraeid*, este prezentat în apendicele 5 [a se vedea și (48) (51) (52)].
28. Viermii folosiți în teste ar trebui să nu prezinte boli, anormalități sau paraziți vizibili.

#### **DESFĂȘURAREA TESTULUI**

29. Organismele testate sunt expuse la substanța chimică testată în timpul fazei de absorbție. Faza de absorbție ar trebui să dureze 14 zile (la enchytreide) sau 21 de zile (la râme), cu excepția cazului în care se demonstrează că s-a atins starea de echilibru.

## ▼ M4

30. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sol fără substanță chimică testată. Prima probă ar trebui să fie prelevată la 4-24 h după inițierea fazei de eliminare. Exemple de grafice de prelevare pentru ziua 21 a unei faze de absorbție și ziua 21 a unei faze de eliminare sunt prezentate în apendicele 3.

#### Organismele testate

31. Pentru multe specii de enchytreide terestre greutatea individuală este foarte mică (de exemplu, 5-10 mg greutate umedă pe individ pentru *Enchytraeus albidus* și mai mică pentru *Enchytraeus crypticus* sau *Enchytraeus luxuriosus*); pentru a efectua măsurători ale greutății și analiza chimică este posibil să fie necesar ca viermii din vasele de testare duplicate să fie puși laolaltă (adică vor fi utilizați toți viermii dintr-un vas duplicat pentru a obține un răspuns pentru țesutul analizat). În fiecare vas duplicat se adaugă 20 de enchytreide și ar trebui utilizate cel puțin trei vase duplicate. Dacă limita de detecție analitică a substanței chimice testate este mare vor fi necesari mai mulți viermi. Pentru speciile testate cu greutate individuală mai mare (*Eisenia fetida* și *Eisenia andrei*), pot fi utilizate vase duplicate care conțin un individ.
32. Râmele folosite într-un test ar trebui să aibă greutate asemănătoare (de exemplu, *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* ar trebui să aibă o greutate individuală de 250-600 mg). Enchytreidele (de exemplu *Enchytraeus albidus*) ar trebui să aibă lungimea de aproximativ 1 cm. Toți viermii folosiți într-un anumit test ar trebui să provină din aceeași sursă și ar trebui să fie animale adulte cu clitelum (a se vedea apendicele 5). Deoarece greutatea și vârsta unui animal pot afecta valorile BAF (de exemplu, datorită conținutului diferit de lipide și/sau al prezenței ouălor), acești parametri ar trebui înregistrați cu acuratețe și avuți în vedere la interpretarea rezultatelor. În plus, în timpul perioadei de expunere pot fi depuși coconi, care vor avea de asemenea un impact asupra valorilor BAF. Este indicat ca o subprobă din viermii testați să fie cântărită înainte de experiment, pentru estimarea greutăților medii umede și uscate.
33. Ar trebui utilizat un raport sol-vierme mare pentru a se micșora creșterea concentrației substanței chimice testate în sol în timpul fazei de absorbție. Pentru *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* se recomandă o cantitate minimă de 50 g greutate uscată (g.u.) de sol pe vierme, iar pentru enchytreide un minim de 10-20 g.u. de sol pe vas de testare. Vasele ar trebui să conțină un strat de sol de 2-3 cm (pentru enchytreide) sau de 4-5 cm (pentru râme).
34. Viermii folosiți într-un test sunt scoși din cultură (de exemplu, enchytreidele prin utilizarea pensetelor de bijutier). Animalele adulte sunt transferate într-un sol de test netratat, pentru aclimatizare, și hrănite (a se vedea punctul 36). În cazul în care condițiile de testare diferă de condițiile de creștere, o fază de aclimatizare de 24-72 h ar trebui să fie suficientă pentru adaptarea viermilor la condițiile de testare. După aclimatizare, râmele sunt clătite prin transferarea în recipiente de sticlă (de exemplu, cutii Petri) care conțin apă curată, iar ulterior, înainte de a fi adăugate în solul de testare, sunt cântărite. Înaintea cântăririi, trebuie îndepărtat excesul de apă din viermi apăsându-i ușor de marginea recipientului sau tamponându-i cu atenție până se usucă, cu un prosop de hârtie puțin umezit.
35. Comportamentul organismelor la intrarea în sol ar trebui urmărit și înregistrat. În mod obișnuit, în testele cu râme, animalele (loturile de control și cele tratate) intră în sol în decurs de câteva ore; acest lucru ar trebui verificat după cel mult 24 h de la adăugarea viermilor în vasele de testare. În cazul în care râmele nu reușesc să intre în sol (de exemplu, mai mult de 10 % nu intră în sol într-un timp care depășește jumătate din faza de absorbție), aceasta indică faptul că fie condițiile de testare nu sunt



**▼ M4**

adecvate, fie organismele testate nu sunt sănătoase. În acest caz, testul ar trebui oprit și repetat. Enchitreidele trăiesc în principal în porii interstițiali ai solului și deseori tegumentul acestora poate intra doar parțial în contact cu substratul înconjurător; expunerea enchitreidelor care au intrat în sol și a celor care nu au intrat se presupune a fi echivalentă, iar neintrarea în sol a enchitreidelor nu impune în mod necesar repetarea testului.

**Hrănirea**

36. Hrănirea ar trebui să fie avută în vedere când este utilizat un sol cu conținut de carbon organic total scăzut. Atunci când se utilizează un sol artificial, se recomandă o rație alimentară săptămânală (adică viermii trebuie hrăniți o dată pe săptămână) de 7 mg de bălegar uscat pe g de sol greutate uscată pentru râme, iar pentru enchitreide se recomandă o rație săptămânală de 2-2,5 mg de bază de fulgi de ovăz măcinați pe g de sol greutate uscată (11). Prima rație alimentară ar trebui amestecată cu solul imediat înainte de adăugarea organismelor de testare. Ar trebui utilizat de preferat același tip de hrană cu cel din culturi (a se vedea appendicele 5).

**Lumina și temperatura**

37. Testele ar trebui să se desfășoare la un ciclu controlat lumină/întuneric de 16/8 ore, de preferat la un nivel de iluminare în zona vaselor de testare de 400-800 lx (3). Temperatura de testare ar trebui să fie  $20 \pm 2$  °C pe tot parcursul testului.

**Concentrațiile substanței testate**

38. Se folosește o singură concentrație a substanței testate. Cazurile în care este (sunt) necesară (necesare) o concentrație (concentrații) suplimentară (suplimentare) a(le) substanței testate ar trebui să fie justificate. Dacă toxicitatea (CE<sub>50</sub>) a substanței chimice testate este apropiată de limita de detecție analitică, se recomandă utilizarea unei substanțe chimice de testat marcată radioactiv, cu o radioactivitate specifică ridicată. Pentru metale, concentrația substanței testate ar trebui să depășească nivelul de bază din țesut și din sol.

**Vase duplicat**

39. Pentru măsurătorile cinetice (faza de absorbție și faza de eliminare), numărul minim de vase duplicat tratate ar trebui să fie de trei pentru fiecare punct de prelevare a probelor. Numărul total de vase duplicat pregătite ar trebui să fie suficient pentru a acoperi toate intervalele de prelevare a probelor din timpul fazei de absorbție și al fazei de eliminare.
40. Pentru observațiile și măsurătorile biologice (de exemplu, raport greutate uscată- greutate umedă, conținut de lipide) și pentru analiza concentrațiilor de bază ale substanței testate din viermi și din sol, ar trebui prevăzute cel puțin 12 vase duplicat ale unui martor negativ (patru probe prelevate la inițiere, patru la finalizarea absorbției și patru la finalizarea eliminării) dacă nu este utilizat un alt solvent în afară de apă. Dacă pentru aplicarea substanței chimice testate se utilizează orice agent de solubilizare, pe lângă vasele duplicat tratate, ar trebui realizat un martor tratat cu solvent (ar trebui prelevate probe din patru vase duplicat la inițiere, din patru la finalul fazei de absorbție și din patru la finalul fazei de eliminare) care să conțină toți constituenții, mai puțin substanța testată. În acest caz, este posibil să fie prevăzute patru vase duplicat suplimentare cu martor negativ (fără solvent) pentru prelevarea opțională de probe la finalul fazei de absorbție. Aceste vase duplicat pot fi comparate din punct de vedere biologic cu martorul tratat cu solvent pentru a se obține informații privind posibila influență a solventului asupra organismelor testate. Se recomandă realizarea unui număr suficient de vase duplicat de rezervă suplimentare (de exemplu, opt) pentru tratament și martor(i).



▼ **M4****Frecvența de măsurare a calității solului**

41. pH-ul solului, conținutul de umiditate al solului și temperatura (permanentă) din camera de testare trebuie măsurate la începutul și la finalul fazelor de absorbție și de eliminare. O dată pe săptămână ar trebui controlat conținutul de umiditate al solului prin cântărirea vaselor de testare și compararea greutateților curente cu greutatețile inițiale de la începutul testului. Pierderile de apă ar trebui compensate prin adăugarea de apă deionizată.

**Prelevarea probelor și analiza viermilor și a solului**

42. Un exemplu de grafic pentru fazele de absorbție și de eliminare în testele de bioacumulare la râme și enchitreide este prezentat în apendicele 3.
43. Probele de sol se prelevează din vasele de testare pentru determinarea concentrației substanței chimice testate înainte de introducerea viermilor și în timpul fazelor de absorbție și de eliminare. În timpul testului, concentrațiile substanței chimice testate se determină în viermi și în sol. În general, se măsoară concentrațiile totale din sol. Opțional, pot fi măsurate concentrațiile din apa interstițială; în acest caz, ar trebui asigurate metode justificate și adecvate, anterior inițierii unui studiu, și incluse în raport.
44. Probele din viermi și sol se prelevează de cel puțin șase ori în timpul fazelor de absorbție și de eliminare. Dacă stabilitatea unei substanțe chimice testate este demonstrată, numărul de analize ale solului poate fi redus. Se recomandă analizarea a cel puțin trei vase duplicate la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție. În cazul în care concentrația substanței testate din sol măsurată la sfârșitul fazei de absorbție diferă față de concentrația inițială cu mai mult de 30 %, ar trebui ca probele de sol prelevate la alte date să fie, de asemenea, analizate.
45. Se scot viermii din solul dintr-un vas duplicat dat de fiecare dată când se prelevează probe (de exemplu, după ce solul dintr-un vas duplicat a fost întins pe o tavă puțin adâncă și au fost scoși viermii folosind pensete moi de bijutier), se spală rapid cu apă într-un pahar puțin adânc sau pe o tavă de oțel. Se îndepărtează apa în exces (a se vedea punctul 34). Se transferă viermii cu grijă într-un vas precântărit, se cântăresc imediat, inclusiv conținutul intestinelor.
46. Râmelor (*Eisenia* sp.) ar trebui apoi să li se permită să purjeze conținutul intestinelor în timpul nopții, de exemplu pe un filtru de hârtie umed într-o cutie Petri acoperită (a se vedea punctul 34). După purjare, ar trebui determinată greutatea viermilor pentru a se putea evalua posibila scădere a biomasei în timpul testului (a se vedea criteriile de validare de la punctul 17). Cântărirea și analiza țesutului enchitreidelor se realizează fără purjare, deoarece este dificil de realizat din punct de vedere tehnic datorită dimensiunii mici a acestor viermi. După determinarea greutateții finale, viermii ar trebui omorâți imediat, folosind metoda cea mai adecvată (de exemplu, folosind azot lichid sau înghețarea la temperaturi sub – 18 °C).
47. În timpul fazei de eliminare, viermii înlocuiesc conținutul contaminat al intestinelor cu sol curat. Aceasta înseamnă că măsurătorile viermilor nepurjați (în acest context enchitreide) din care s-au prelevat probe imediat după faza de eliminare includ sol contaminat în intestine. Pentru oligochetele acvatice se presupune că după primele 4-24 h ale fazei de eliminare cea mai mare parte a conținutului contaminat din intestine a fost înlocuit cu sediment curat, de exemplu (46). Constatări similare au fost raportate pentru râme în studiile privind acumularea de cadmiu și zinc marcate radioactiv (78). În enchitreidele nepurjate, concentrația acestei prime probe din faza de eliminare poate fi considerată drept concentrația din țesut după purjarea intestinelor. Pentru a ține cont de diluția concentrației substanței testate în funcție de solul necontaminat în timpul fazei de eliminare, greutatea conținutului intestinelor poate fi estimată din raportul greutate umedă vierme/greutate cenușă vierme.

▼ **M4**

48. Probele de sol și de vierme ar trebui analizate, de preferință, imediat după ce au fost prelevate (adică în decurs de 1-2 zile) pentru a se preveni degradarea sau alte pierderi și se recomandă calcularea vitezelor de absorbție și de eliminare aproximative pe măsură ce testul avansează. În cazul în care analiza este întârziată, probele ar trebui păstrate folosind o metodă corespunzătoare, de exemplu prin congelare ( $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
  
49. Ar trebui verificat faptul că precizia și reproductibilitatea analizei chimice, precum și recuperarea substanței chimice testate din probele de sol și de viermi sunt satisfăcătoare pentru metoda dată; ar trebui raportate randamentul extracției, limita de detecție și limita de cuantificare. În mod similar, ar trebui verificat faptul că substanța chimică testată nu este detectabilă în vasele cu martor la concentrații mai mari decât cea de bază. Atunci când concentrația unei substanțe chimice testate în organismul testat Ca este  $> 0$  în viermii din probele martor, aceasta ar trebui inclusă în calculul parametrilor cinetici (a se vedea apendicele 2). Toate probele trebuie manipulate în timpul testului astfel încât să se reducă contaminarea și pierderea (care ar putea rezulta, de exemplu, din adsorbția substanței chimice testate pe dispozitivul de prelevare a probelor).
  
50. Când se lucrează cu substanțe chimice testate marcate radioactiv este posibil să se analizeze substanța de origine și metaboliții. Cuantificarea substanței chimice testate de origine și a metaboliților la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție furnizează informații importante. Probele ar trebui să fie apoi „curățate” astfel încât substanța chimică testată de origine să poată fi cuantificată separat. Dacă metaboliții simpli depășesc 10 % din radioactivitatea totală în proba (probele) analizate, se recomandă identificarea acestor metaboliți.
  
51. Recuperarea globală și recuperarea substanței chimice testate din viermi, din sol și, dacă sunt utilizate, din separatoarele care conțin substanțe absorbante pentru a reține substanța chimică testată evaporată, ar trebui înregistrate și raportate.
  
52. Gruparea probelor provenite de la indivizii dintr-un vas de testare dat este acceptabilă pentru viermii enchitreide care sunt mai mici decât râmele. Dacă gruparea implică reducerea numărului de vase duplicat, aceasta limitează procedurile statistice care pot fi aplicate datelor. Dacă se cere o procedură statistică specifică și o anumită putere, atunci ar trebui inclus în test un număr adecvat de vase de testare duplicat pentru a se adapta grupării, procedurii și puterii cerute.
  
53. Se recomandă ca BAF să fie exprimat atât în funcție de greutatea uscată totală, cât și, dacă este necesar (adică pentru substanțele chimice foarte hidrofobe), în funcție de conținutul de lipide. Ar trebui utilizate metode adecvate pentru determinarea conținutului de lipide [unele metode existente – de exemplu (31) sau (58) – ar trebui adaptate în acest scop]. Aceste metode utilizează o tehnică de extracție cloroform/metanol. Totuși, pentru a evita utilizarea solvenților clorurați, ar trebui utilizată o modificare a metodei Bligh și Dyer (9) astfel cum este descrisă în (17). Întrucât metodele diferite nu oferă rezultate identice, este important să se precizeze detaliile metodei utilizate. Când este posibil, adică atunci când este disponibil suficient țesut de vierme, ar fi ideal ca analiza lipidelor să se facă pe aceleași probe sau extracte utilizate și pentru analiza substanței chimice testate, întrucât, deseori lipidele trebuie îndepărtate din extras înainte ca acesta să poată fi analizat prin cromatografie (49). Ca alternativă, animalele martor pot fi folosite pentru a măsura conținutul de lipide, care poate fi utilizat apoi pentru ajustarea valorilor BAF. Această din urmă abordare reduce contaminarea echipamentelor cu substanța chimică testată.

**▼ M4****DATE ȘI RAPORT****Interpretarea rezultatelor**

54. Curba de absorbție a substanței chimice testate va rezulta prin trasarea concentrației sale din/de pe viermi în funcție de timp, în perioada fazei de absorbție, folosind o scară aritmetică. Când curba a atins un platou sau starea de echilibru (a se vedea definiția din apendicele 1), factorul de bioacumulare al stării de echilibru (BAF<sub>ss</sub>) se calculează din:

$$\frac{C_a \text{ la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție (medie)}}{C_s \text{ la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție (medie)}}$$

$C_a$  este concentrația substanței chimice testate în organismul testat

$C_s$  este concentrația substanței chimice testate în sol

55. Când nu se atinge starea de echilibru, BAF<sub>K</sub>, ar trebui determinat în schimb BAF<sub>ss</sub>, pe baza constantelor vitezei, astfel cum este descris mai jos:

- se determină factorul de acumulare (BAF<sub>K</sub>) ca raport între  $k_s/k_e$ ;
- este de preferat ca vitezele de absorbție și de eliminare să fie calculate simultan (a se vedea ecuația 11 din apendicele 2);
- constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ) se determină de obicei din curba de eliminare (adică un grafic al concentrației substanței testate din viermi în timpul fazei de eliminare). Constanta vitezei de absorbție  $k_s$  se calculează apoi în funcție de  $k_e$  și de o valoare  $C_a$  care se determină din curba de absorbție — a se vedea apendicele 2 pentru descrierea acestor metode. Metoda cea mai bună pentru obținerea BAF<sub>K</sub> și a constantelor de viteză  $k_s$  și  $k_e$ , este aceea care recurge la metode informatice neliniare de estimare a parametrilor. Dacă este clar că eliminarea nu este de ordinul întâi, atunci ar trebui utilizate modele mult mai complexe.

**Raportul de testare**

56. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

*Substanța chimică testată:*

- orice informație disponibilă cu privire la toxicitatea acută sau pe termen lung (de exemplu, CE<sub>x</sub>, CL<sub>x</sub>, CFEO) a substanței chimice testate față de oligochetele bentice;
- puritatea, natura fizică și proprietățile fizico-chimice, de exemplu log K<sub>ow</sub>, solubilitatea în apă;
- datele de identificare a substanței chimice; sursa substanței testate, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat;
- dacă se utilizează o substanță chimică de testat marcată radioactiv, poziția exactă a atomilor marcați, radioactivitatea specifică și puritatea radiochimică.

*Speciile folosite pentru testare:*

- denumire științifică, sușă, sursă, orice tratament prealabil eventual, acclimatizare, vârstă, gama de dimensiuni etc.

▼ **M4***Condițiile de testare:*

- procedura de încercare utilizată;
- tipul și caracteristicile iluminării utilizate și perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- protocolul testului (de exemplu, numărul și dimensiunea vaselor de testare, masa solului și înălțimea stratului de sol, numărul de duplicate, numărul de viermi, numărul de concentrații testate, durata fazelor de absorbție și de eliminare, frecvența prelevării);
- justificarea alegerii materialului vasului de testare;
- metoda de preparare și aplicare a substanței testate, precum și motivele alegerii acestei metode specifice;
- concentrațiile experimentale nominale, mediile valorilor măsurate și abaterea standard ale acestora în vasele de testare, precum și metoda prin care aceste valori au fost obținute;
- sursa constituenților solului artificial sau – dacă sunt utilizate medii naturale – originea solului, descrierea oricărui pretratament, rezultatele verificărilor (supraviețuire, dezvoltarea de biomasă, reproducere), caracteristicile solului [pH, conținut de carbon organic total, granulometrie (procent de nisip, aluviuni și argilă),  $CRA_{max}$ , conținut procentual de apă la începutul și la sfârșitul testului și orice alte măsurători realizate];
- informații detaliate privind tratamentul probelor de sol și de vierme, inclusiv detalii privind prepararea, păstrarea, procedurile de îmbogățire, extracție și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța testată din viermi și din sol și conținutul de lipide (dacă a fost măsurat) și recuperările substanței testate.

*Rezultatele:*

- mortalitatea viermilor martor și a viermilor din fiecare vas de testare și orice comportament anormal observat (de exemplu, evitarea solului, lipsa reproducerii într-un test de bioacumulare cu enchitreide);
- raportul greutate uscată/greutate umedă al solului și al organismelor testate (util pentru normalizare);
- greutatea umedă ale viermilor la fiecare prelevare de probe; pentru râme, greutatea umedă la începutul și la sfârșitul testului și la fiecare prelevare de probe înainte și după purjarea intestinelor;
- conținutul de lipide al organismelor testate (dacă a fost determinat);
- curbe care indică cinetica de absorbție și de eliminare ale substanței chimice testate în viermi și timpul până la starea de echilibru;
- $C_a$  și  $C_s$  (împreună cu abaterea standard și intervalul, dacă este cazul) pentru toate momentele de prelevare a probelor ( $C_a$  exprimată în  $g\ kg^{-1}$  greutate umedă și uscată a întregului organism,  $C_s$  exprimată în  $g\ kg^{-1}$  greutate umedă și uscată a solului). Dacă se cere un factor de acumulare biotă-sol (BSAF) (de exemplu, pentru compararea rezultatelor obținute din două sau mai multe teste efectuate cu animale cu conținut diferit de lipide),  $C_a$  poate fi exprimată suplimentar ca  $g\ kg^{-1}$  conținut de lipide din organism, iar  $C_s$  poate fi exprimată ca  $g\ kg^{-1}$  carbon organic (CO) din sol;
- BAF (exprimat în  $kg\ sol\ kg^{-1}$  vierme), constanta vitezei de absorbție  $k_s$  (exprimată în  $g\ sol\ kg^{-1}$  de vierme  $zi^{-1}$ ) și constanta vitezei de eliminare  $k_e$  (exprimată în  $zile^{-1}$ ); BSAF (exprimat în  $kg\ sol\ CO\ kg^{-1}$  conținut de lipide vierme) pot fi raportate suplimentar;

▼ **M4**

— dacă se măsoară: procentajele substanței chimice testate de origine, ale metaboliților și reziduurilor legate (adică procentul de substanță chimică testată care nu poate fi extras prin metode de extracție obișnuite) detectate în sol și în animalele testate;

— metodele utilizate pentru analizele statistice ale datelor.

*Evaluarea rezultatelor:*

— concordanța rezultatelor cu criteriile de validitate, astfel cum sunt enumerate la punctul 17;

— rezultatele neprevăzute sau neobișnuite, de exemplu, eliminarea incompletă a substanței chimice testate din animalele testate.

*BIBLIOGRAFIE:*

- (1) Amorim M (2000), Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004), Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*, ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), The assessment of bioaccumulation. În Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil, Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. și Hermens J. (1993), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water, Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*), Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell A.W. (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*, Ann. WHX Novitat., 1902: 1-13.
- (9) Bligh E.G. și Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M. (1972), Lombriciens de France. Ecologie et Systematique, INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.
- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a), Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Raport către Agenția federală germană de mediu (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida), Hydrobiologia 463: 185-196.
- (13) Conder J.M. și Lanno R.P. (2003), Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*, J. Soils Sediments 3: 13-20.

## ▼M4

- (14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990), Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System, *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden W.A.M. (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W. (2003), Oligochaeta, în: Bioindicators and biomonitoring. Markert B.A., Breure A.M. și Zechmeister H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Țările de Jos, pp. 555-576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei (JO L 396, 30.12.2006, p. 1).
- (20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996), Biology and ecology of earthworms, third edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- (21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009), Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Poate fi descărcat de la: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N. și Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000), Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations, National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant, Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003), Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull. OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C. (1996), How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?, *Chemosphere* 32: 1897-1905.
- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994), The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C. (1996), Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

## ▼M4

- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003), Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes, Wat. Res. 24: 1225-1231.
- (31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985), Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates, Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.
- (32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish, Wat. Res. 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000), Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, J. Soils Sediments 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. În: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-traeager, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Calitatea solului – Efectele poluanților asupra râmelor (*Eisenia fetida*). Partea 2: Determinarea efectelor asupra reproducerii.
- (36) Jaenike J. (1982), „*Eisenia foetida*” is two biological species, Megadrilogica 4: 6-8.
- (37) Jager T (1998), Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.
- (38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil, Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.
- (40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.
- (41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K. (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, Pedobiologia 23: 217-232.
- (43) Khalil A.M. (1990), Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Disertație, Universitatea München, 137 pp.
- (44) Landrum P.F. (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.
- (45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997), Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.
- (46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*, Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.



## ▼M4

- (47) Nendza M. (1991), QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log  $K_{ow}$ /log BCF correlations, în: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.
- (49) Capitolul C.13 din prezenta anexă, „Bioconcentrarea: Experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor”.
- (50) Capitolul C.21 din prezenta anexă, „Microorganisme din sol: Testul de transformare a azotului”.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes, *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips D.J.H. (1993), Bioaccumulation. În: Handbook of Ecotoxicology, vol. 1, Calow P. (ed.), Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- *Z. Umweltchem, Ökotox.* 4: 77-81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996), Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*, RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall R.C., Lee II H, Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J., Egele P, Füll C. (1998), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium, UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. and Moser Th. (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Enchytraeen als Testorganismen, în: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb, R., Dott W. & Eisentraeger A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H., (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.
- (63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efrogmson R.A. (1999), Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation, *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung, *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R. and Collado R. (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida), *Carolinea* 57: 93-100.



## ▼M4

- (66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985), Earthworms, în: Kermack, D.M. & Barnes, R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish, Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.
- (69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998), Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. În: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*, Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug, UBA-Texte 42/91, Berlin.
- (72) US EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, martie 2000.
- (73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996), Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992), The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, in: Ecotoxicology of Earthworms (ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. și Heimbach F.), Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C.A. și Ma W.-C. (1990), An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, Chemosphere 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005), Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates, Environmental Pollution 136: 409-417.
- (77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988), The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), South African J. Zool. 23: 161-165.
- (78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005), Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil, Soil Biol. Biochem. 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996), Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼ **M4***Apendicele 1*

## DEFINIȚII

**Bioacumulare:** creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism în raport cu concentrația acestei substanțe chimice în mediul ambiant. Bioacumularea rezultă atât din procesul de bioconcentrare, cât și din cel de bioamplificare (a se vedea mai jos).

**Bioconcentrare:** creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism, care rezultă din absorbția substanței chimice exclusiv din mediul înconjurător (adică prin intermediul suprafeței corpului și al solului ingerat), în raport cu concentrația substanței chimice testate în mediul înconjurător.

**Bioamplificare:** creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism, care rezultă în principal din acumularea alimentelor sau prăzii contaminate, în raport cu concentrația substanței chimice testate în hrană sau în pradă. Bioamplificarea poate duce la un transfer sau la o acumulare a substanței testate în rețelele trofice.

**Eliminarea unei substanțe chimice testate:** pierderea acestei substanțe din țesutul organismului testat, prin procese active sau pasive, care se produc independent de prezența substanței testate în mediul înconjurător.

**Factorul de bioacumulare (BAF):** la orice moment în timpul fazei de absorbție a acestui test, factorul de bioacumulare reprezintă concentrația substanței chimice testate în/pe organismul testat ( $C_a$  în  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  greutate uscată vierme) împărțită la concentrația substanței chimice în mediul înconjurător ( $C_s$  exprimată în  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  greutate uscată sol); unitatea de măsură pentru BAF este  $\text{kg sol}\cdot\text{kg}^{-1}$  vierme.

**Factorul de bioacumulare al stării de echilibru ( $\text{BAF}_{ss}$ ):** BAF la starea de echilibru și nu se modifică în mod semnificativ în cursul unui interval lung de timp, concentrația substanței chimice testate în mediul înconjurător ( $C_s$  exprimată în  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  greutate uscată sol) fiind constantă în acest interval de timp.

**Factorii de bioacumulare** calculați direct din raportul dintre constanta vitezei de absorbție și constanta vitezei de eliminare ( $k_s$  și  $k_e$ , a se vedea mai jos) poartă denumirea de *factor de bioacumulare cinetic* ( $\text{BAF}_k$ ).

**Factorul de acumulare biotă-sol (BSAF):** concentrația normalizată de lipide a substanței chimice testate în/pe organismul testat împărțită la concentrația normalizată de carbon organic a substanței chimice testate în sol la starea de echilibru. Astfel,  $C_a$  se exprimă în  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  conținut de lipide al organismului, iar  $C_s$  în  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  conținut organic al solului; unitatea de măsură pentru BSAF este  $\text{kg CO}\cdot\text{kg}^{-1}$  lipide.

**Platou sau stare de echilibru:** echilibrul între procesele de absorbție și de eliminare care apar simultan în timpul fazei de expunere. Starea de echilibru este atinsă în graficul BAF în funcție de timp atunci când curba devine paralelă la axa timpului, iar trei analize succesive ale BAF – realizate asupra unor probe prelevate la intervale de cel puțin două zile – se mențin într-o plajă de 20 % una față de alta și nu există diferențe semnificative între cele trei perioade de prelevare a probelor. Pentru substanțele chimice testate care se absorb lent, intervalele cele mai adecvate ar fi de șapte zile (49).

**Coefficientul de partiție carbon organic-apă ( $K_{oc}$ ):** raportul dintre o substanță chimică în/pe fracția de carbon organic a unui sol și concentrația substanței chimice în apă la echilibru.

**Coefficientul de partiție octanol-apă ( $K_{ow}$ ):** raportul dintre solubilitatea unei substanțe chimice în n-octanol și în apă la echilibru, exprimată uneori și ca  $P_{ow}$ . Logaritmul lui  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare al unei substanțe chimice în organismele acvatice.

**▼M4**

**Faza de absorbție sau de expunere:** timpul în care organismele testate sunt expuse la substanța chimică testată.

**Constanta vitezei de absorbție a solului ( $k_s$ ):** reprezintă valoarea numerică care definește viteza de creștere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat care rezultă din absorbția fazei solului.  $k_s$  se exprimă în g sol kg<sup>-1</sup> vierme z<sup>-1</sup>.

**Faza de eliminare:** timpul, după transferul organismelor dintr-un mediu contaminat într-un mediu în care nu se află substanța testată, în care se studiază eliminarea (sau pierderea netă) a substanței chimice din organismele testate.

**Constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ):** valoarea numerică care definește viteza de scădere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat, după transferul organismelor testate dintr-un mediu care conține substanța testată într-un mediu fără substanță chimică;  $k_e$  se exprimă în z<sup>-1</sup>.

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼ **M4***Apendicele 2***Calculul parametrilor de absorbție și de eliminare**

Principalul indicator al unui test de bioacumulare este factorul de bioacumulare, BAF. BAF măsurat poate fi calculat prin împărțirea concentrației din organismul testat ( $C_a$ ) la concentrația din sol ( $C_s$ ) în starea de echilibru. Dacă starea de echilibru nu este atinsă în timpul fazei de absorbție,  $BAF_K$  se calculează din constantele de viteză în loc de BAFss. Totuși, ar trebui să se indice dacă BAF se bazează pe concentrațiile la starea de echilibru sau nu.

Modalitatea obișnuită pentru obținerea factorului de bioacumulare cinetic ( $BAF_K$ ), a constantei vitezei de absorbție a solului ( $k_s$ ) și a constantei vitezei de eliminare ( $k_e$ ) este utilizarea metodelor informatice neliniare de estimare a parametrilor, de exemplu, pe baza modelelor descrise în (68). Fiind dat un set de date secvențiale concentrație timp și ecuațiile de modelare:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuația 1}]$$

sau

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ecuația 2}]$$

unde:

$C_a$  = concentrația substanței chimice în viermi [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$k_s$  = constanta vitezei de absorbție în țesut [g sol kg-1 vierme z-1]

$C_s$  = concentrația substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$k_e$  = constanta vitezei de eliminare [z-1]

$t_c$  = timpul la finalul fazei de absorbție,

aceste programe informatice calculează valorile pentru  $BAF_K$ ,  $k_s$  și  $k_e$ .

Când concentrația de bază în viermii neexpuși, de exemplu în ziua 0, diferă în mod semnificativ de zero (acesta poate fi, de exemplu, cazul metalelor), această concentrație de bază ( $C_{a,0}$ ) ar trebui inclusă în aceste ecuații, care devin:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuația 5}]$$

și

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ecuația 4}]$$

În cazurile în care se observă o scădere semnificativă în timp a concentrației substanței chimice testate în sol, în cursul fazei de absorbție, pot fi utilizate următoarele modele, de exemplu (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{ecuația 5}]$$

**▼M4**

unde:

$C_s$  = concentrația substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$k_0$  = constanta vitezei de degradare în sol [z-1]

$C_0$  = concentrația inițială a substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuația 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{ecuația 7}]$$

unde:

$C_a$  = concentrația substanței chimice în viermi [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$k_s$  = constanta vitezei de absorbție în țesut [g sol kg-1 vierme z-1]

$k_0$  = constanta vitezei de degradare în sol [z-1]

$k_e$  = constanta vitezei de eliminare [z-1]

$t_c$  = timpul la finalul fazei de absorbție.

Când se atinge starea de echilibru în timpul fazei de absorbție (adică  $t = \infty$ ), ecuația 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuația 1}]$$

poate fi redusă la:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

sau

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{ecuația 8}]$$

Atunci,  $k_s/k_e \times C_s$  reprezintă o aproximare a concentrației substanței testate în țesutul viermelui la starea de echilibru ( $C_{a,se}$ ).

Factorul de acumulare biotă-sol (BSAF) poate fi calculat astfel:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{ecuația 9}]$$

unde  $f_{oc}$  este fracția de carbon organic din sol, iar  $f_{lip}$  este fracția de lipide din vierme, ambele fiind determinate, de preferință, din probele prelevate din test, și bazate fie pe greutatea uscată, fie pe greutatea umedă.

Cinetica eliminării poate fi modelată folosind datele obținute din faza de eliminare și aplicând următoarea ecuație de modelare și o metodă informatică neliniară de estimare a parametrilor. Dacă punctele aferente datelor reprezentate grafic în funcție de timp indică o scădere exponențială constantă a concentrației substanței testate în animale, poate fi utilizat un model cu un compartiment (ecuația 9) pentru a descrie evoluția temporală a eliminării.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ecuația 10}]$$

▼ **M4**

Uneori, procesele de eliminare par a se derula în două etape, indicând o scădere rapidă a  $C_a$  în timpul etapelor de început, care se modifică la o pierdere ușoară a substanțelor testate în etapele finale ale eliminării, de exemplu (27) (68). Cele două etape pot fi interpretate plecând de la ipoteza că în organism există două compartimente diferite din care substanța testată se elimină cu viteze diferite. În aceste cazuri, ar trebui studiată literatura de specialitate relevantă, de exemplu (38) (39) (40) (78).

Folosind ecuațiile de modelare de mai sus, parametrii cinetici ( $k_s$  și  $k_e$ ) pot fi calculați și într-o singură etapă, aplicând modelul cineticii de ordinul întâi, simultan, tuturor datelor obținute din faza de absorbție și din cea de eliminare. Pentru o descriere a unei metode care ar putea permite un astfel de calcul combinat al constantelor vitezei de absorbție și de eliminare, pot fi consultate referințele bibliografice (41), (73) și (70).

$$C_a = \left[ \frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[ \frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{ecuația 11}]$$

*Notă:* Când parametrii de absorbție și de eliminare sunt estimați simultan din datele combinate de absorbție și de eliminare, „m” prezentat în ecuația 11 este un descriptor care permite programului informatic să atribuie subtermenii ecuației setului de date al fazei respective și să realizeze o evaluare corectă (m = 1 pentru faza de absorbție; m = 2 pentru faza de eliminare).

Cu toate acestea, aceste ecuații de modelare ar trebui utilizate cu prudență, mai ales atunci când în timpul testului apar modificări ale biodisponibilității substanței chimice testate sau ale (bio)degradării [a se vedea, de exemplu, (79)].

▼ **M4***Apendicele 3*

## EXEMPLE DE GRAFICE PENTRU TESTE DE BIOACUMULARE ÎN SOL

**Test pe râme**

- (a) Faza de absorbție, cu 8 date de prelevare a probelor utilizate pentru calculul parametrilor cinetici

| Ziua            | Activitate   |
|-----------------|--|
| – 6             | Condiționarea solului preparat timp de 48 h  |
| – 4             | Îmbogățirea fracțiunii de sol cu soluția de substanță chimică testată; evaporarea oricărui solvent; amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; echilibrarea condițiilor de testare timp de 4 zile (3 săptămâni pentru solul îmbogățit cu metale)  |
| – 3 până la – 1 | Separarea organismelor testate din cultură pentru aclimatizare; prepararea și umezirea constituenților solului   |
| 0               | Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; prelevarea de probe din vasele tratate și a martorilor tratați cu solvent pentru determinarea concentrației substanței chimice testate; adăugarea rației alimentare; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; păstrarea unui număr suficient de subprobe de viermi pentru determinarea valorilor analitice de bază, a greutateii umede și uscate și a conținutului de lipide; cântărirea tuturor vaselor de testare pentru verificarea umidității solului; verificarea alimentării cu aer în cazul în care se utilizează un sistem închis |
| 1               | Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței testate  |
| 2               | La fel ca în ziua 1  |
| 3               | Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii   |
| 4               | La fel ca în ziua 1  |
| 5-6             | La fel ca în ziua 3  |
| 7               | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate  |
| 8-9             | La fel ca în ziua 3  |
| 10              | La fel ca în ziua 1  |
| 11-13           | La fel ca în ziua 3  |
| 14              | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate  |
| 15-16           | La fel ca în ziua 3  |
| 17              | La fel ca în ziua 1  |
| 18-20           | La fel ca în ziua 3  |

## ▼ M4

| Ziua | Activitate   |
|------|--|
| 21   | La fel ca în ziua 1; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; finalizarea fazei de absorbție; transferul viermilor din vasele duplicate expuse rămase în vasele care conțin sol curat pentru faza de eliminare (fără purjarea intestinelor); prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent |
|      | Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) ar trebui programate ținând cont de proprietățile substanței chimice testate.  |
|      | Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).  |

## (b) Faza de eliminare

| Ziua                               | Activitate   |
|------------------------------------|--|
| – 6                                | Prepararea și umezirea constituenților solului; condiționarea solului preparat timp de 48 h  |
| – 4                                | Amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; incubarea în condiții experimentale timp de 4 zile   |
| 0 (finalizarea fazei de absorbție) | Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; adăugarea rației alimentare; transferul viermilor din vasele duplicate expuse rămase în vasele care conțin sol curat; prelevarea de probe de sol și viermi după 4-6 h pentru determinarea concentrației substanței chimice testate |
| 1                                  | Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței chimice testate  |
| 2                                  | La fel ca în ziua 1  |
| 3                                  | Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii   |
| 4                                  | La fel ca în ziua 1  |
| 5-6                                | La fel ca în ziua 3  |
| 7                                  | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate  |
| 8-9                                | La fel ca în ziua 3  |
| 10                                 | La fel ca în ziua 1  |
| 11-13                              | La fel ca în ziua 3  |
| 14                                 | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate  |
| 15-16                              | La fel ca în ziua 3  |
| 17                                 | La fel ca în ziua 1  |



▼ **M4**

| Ziua  | Activitate  |
|-------|---|
| 18-20 | La fel ca în ziua 3   |
| 21    | La fel ca în ziua 1; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent |
|       | Prepararea solului înainte de începerea fazei de eliminare ar trebui realizată în același mod ca înainte de faza de absorbție.  |
|       | Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).   |

**Test pe enchitreide**

- (a) Faza de absorbție, cu 8 date de prelevare a probelor utilizate pentru calculul parametrilor cinetici

| Ziua           | Activitate  |
|----------------|---|
| – 6            | Condiționarea solului preparat timp de 48 h   |
| – 4            | Îmbogățirea fracțiunii de sol cu soluția de substanță chimică testată; evaporarea oricărui solvent; amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; echilibrarea condițiilor de testare timp de 4 zile (3 săptămâni pentru solul îmbogățit cu metale)   |
| – 3 până la –1 | Separarea organismelor testate din cultură pentru aclimatizare; prepararea și umezirea constituenților solului  |
| 0              | Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; prelevarea de probe din vasele tratate și a martorilor tratați cu solvent pentru determinarea concentrației substanței chimice testate; adăugarea rației alimentare în sol; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; păstrarea unui număr suficient de subprobe de viermi pentru determinarea valorilor analitice de bază, a greutateii umede și uscate și a conținutului de lipide; cântărirea tuturor vaselor de testare pentru verificarea umidității solului; verificarea alimentării cu aer în cazul în care se utilizează un sistem închis |
| 1              | Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței testate   |
| 2              | La fel ca în ziua 1   |
| 3              | Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii  |
| 4              | La fel ca în ziua 1   |
| 5-6            | La fel ca în ziua 3   |
| 7              | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare în sol; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate  |
| 9              | La fel ca în ziua 1   |
| 10             | La fel ca în ziua 3   |

▼ **M4**

| Ziua  | Activitate  |
|-------|---|
| 11    | La fel ca în ziua 1   |
| 12-13 | La fel ca în ziua 3   |
| 14    | La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare în sol; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; finalizarea fazei de absorbție; transferul viermilor din vasele duplicat expuse rămase în vasele care conțin sol curat pentru faza de eliminare (fără purjarea intestinelor); prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent |
|       | Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) ar trebui programate ținând cont de proprietățile substanței chimice testate.   |
|       | Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).   |

## ▼ M4

## Apendicele 4

**Solul artificial – recomandări pentru preparare și păstrare**

Deoarece este posibil ca solurile naturale care provin dintr-o sursă specifică să nu fie disponibile tot timpul anului, iar organismele indigene, precum și prezența micropoluantilor pot influența testul, se recomandă utilizarea în cadrul acestui test a unui substrat artificial, solul artificial conform capitolului C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme” (48). Mai multe specii testate pot supraviețui, crește și se pot reproduce în acest sol și sunt furnizate standardizarea maximă, precum și comparabilitatea intra- și interlaboratoare a condițiilor de testare și a cultivare.

## Constituenții solului

|                     |       |  |
|---------------------|-------|--|
| Turbă:              | 10 %  | Mușchi de turbă, în conformitate cu Orientarea 207 a OCDE (48)   |
| Nisip de cuarț:     | 70 %  | Nisip de cuarț industrial (uscat cu aer); dimensiune granule: mai mult de 50 % dintre particule ar trebui să se afle în intervalul 50-200 μm, însă toate particulele ar trebui să fie ≤ 2 mm |
| Argilă caolinică:   | 20 %  | Conținut de caolinit ≥ 30 %  |
| Carbonat de calciu: | ≤ 1 % | CaCO <sub>3</sub> , pulbere, chimic pur  |

Ca alternativă, conținutul de carbon organic din solul artificial poate fi redus, de exemplu prin scăderea conținutului de turbă la 4-5 % din solul uscat și creșterea corespunzătoare a conținutului de nisip. Prin această reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de absorbție ale substanței chimice testate în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice testate pentru viermi (74). S-a demonstrat că *Enchytraeus albidus* și *Eisenia fetida* pot satisface criteriile privind reproducerea când sunt testate pe soluri naturale cu conținut scăzut de carbon organic, de exemplu 2,7 % (33) (61), și s-a constatat experimental că aceasta se poate obține și în soluri artificiale cu 5 % turbă.

**Preparare**

Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare). Această operațiune trebuie realizată cu o săptămână înainte de inițierea testului. Constituenții solului uscați amestecați ar trebui umeziți cu apă deionizată timp de cel puțin 48 h înainte de aplicarea substanței testate pentru a se echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și soluție 1 M KCl într-un raport de 1:5. Dacă valoarea pH-ului nu este în intervalul cerut (6,0 ± 0,5), solului i se adaugă o cantitate suficientă de CaCO<sub>3</sub> sau se prepară un nou lot de sol.

Capacitatea maximă de reținere a apei (CRA) a solului artificial se determină în conformitate cu ISO 11268-2 (35). Cu cel puțin două zile înainte de inițierea testului, solul artificial uscat este umezit adăugându-se suficientă apă deionizată sau apă reconstituită pentru a se obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă. Conținutul final de apă ar trebui să fie de 40 % până la 60 % din CRA. La inițierea testului, solul preumezit este împărțit într-un număr de loturi egal cu numărul concentrațiilor substanței chimice testate și al marilor utilizați pentru test, iar conținutul de umiditate se ajustează la 40-60 % din CRA<sub>max</sub> utilizând soluția de substanță testată și/sau adăugând apă deionizată sau reconstituită. Conținutul de umiditate se determină la începutul și la sfârșitul testului (la 105 °C). Acesta ar trebui să fie optim pentru satisfacerea cerințelor speciilor (conținutul de umiditate poate fi verificat, de asemenea, după cum urmează: atunci când solul este strâns ușor în mână, ar trebui să apară picături mici de apă între degete).

**▼ M4****Păstrare**

Constituenții uscați ai solului artificial pot fi păstrați la temperatura camerei până la utilizare. Solul preparat și preumezit poate fi păstrat într-un loc răcoros timp de până la trei zile anterior îmbogățirii; trebuie redus riscul de evaporare a apei. Solul îmbogățit cu substanța testată ar trebui utilizat imediat, exceptând cazul în care există informații care indică faptul că acel sol poate fi păstrat fără a fi afectate toxicitatea și biodisponibilitatea substanței testate. Probele de sol îmbogățit pot fi păstrate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță testată.

▼ **M4***Apendicele 5***Specii de oligochete terestre recomandate pentru testarea bioacumulării din sol****Râme**

Specia recomandată pentru test este *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), care aparține familiei *Lumbricidae*. Din 1972 aceasta este împărțită în două subspecii [*Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* (10)]. Conform Jaenike (36), acestea sunt specii autentice și separate. *Eisenia fetida* este ușor de recunoscut prin dungile sale galbene de culoare deschisă poziționate intersegmentar, în timp ce *Eisenia andrei* are o culoare uniformă, roșu închis. Fiind probabil originare din regiunea Mării Negre, în prezent acestea sunt prezente în întreaga lume, mai ales în habitatele modificate de activitatea antropică, cum sunt grămezile de compost. Ambele pot fi utilizate pentru teste ecotoxice, precum și pentru teste de bioacumulare.

*Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* sunt disponibile în comerț, de exemplu ca momeală pentru pești. Comparativ cu celelalte râme lumbricide, acestea au un ciclu de viață scurt, ajungând la maturitate în aproximativ 2-3 luni (la temperatura camerei). Temperatura optimă pentru acestea este de aproximativ 20-24 °C. Ele preferă substraturi relativ umede, cu un pH aproape neutru și un conținut ridicat de material organic. Întrucât, în ultimii 25 de ani, aceste specii au fost utilizate pe scară largă în teste ecotoxice standardizate, creșterea lor este bine stabilită (48) (77).

Ambele specii pot fi înmulțite într-o gamă largă de deșeuri animale. Mediul de înmulțire recomandat de ISO (35) este un amestec de bălegar de cal sau bovine și turbă în raport de 50:50. Mediul ar trebui să aibă o valoare a pH-ului de 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu), o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mS/cm sau o concentrație de sare mai mică de 0,5 %) și ar trebui să nu fie contaminat excesiv cu amoniac sau urină de origine animală. De asemenea, poate fi utilizat un sol de grădină disponibil în comerț, fără aditivi, sau un sol artificial în conformitate cu OCDE (48) sau un amestec 50:50 din ambele. Substratul trebuie să fie umed, dar nu prea ud. Sunt adecvate cutii de înmulțire cu un volum de 10 litri până la 50 de litri.

Pentru a se obține viermi cu o vârstă și greutate standard, cel mai bine este să se înceapă cu creșterea de coconi. Astfel, sunt adăugați viermi adulți în cutia de înmulțire, care conține un substrat proaspăt, pentru a produce coconi. Experiența practică a demonstrat că o densitate a populației de aproximativ 100 de viermi adulți pe kg de substrat (greutate umedă) conduce la rate de producție bune. După 28 de zile, viermii adulți sunt scoși. Rămele care au ieșit din coconi sunt folosite pentru testare când ajung la maturitate, după cel puțin 2 luni, dar fără să depășească 12 luni.

Viermii din speciile descrise mai sus pot fi considerați sănătoși dacă se mișcă prin substrat, nu încearcă să părăsească substratul și se reproduc continuu. O extremitate posterioară care se mișcă foarte lent sau este galbenă (în cazul *Eisenia fetida*) indică epuizarea substratului. În acest caz, se recomandă substrat proaspăt și/sau un număr mai mic de animale pe cutie.

**Referințe bibliografice selecționate suplimentare**

Gerard B.M. (1964), Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae, Linnean Soc., London, 6: 1-58.

Graff O. (1953), Die Regenwürmer Deutschlands, Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden, Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955), Some aspects of earthworm ecology, Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼ **M4**

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985), A synopsis of the earthworms, Linnean Soc., London, 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984), The earthworm bait market in North America. În: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell J.E. (ed.), Chapman și Hall, London, pp. 331-338.

**Enchitreide**

Specia recomandată pentru test este *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (viermele alb). *Enchytraeus albidus* este una dintre cele mai mari specii (până la 15 mm) din familia oligochetelor anelide *Enchytraeidae* și este prezentă în întreaga lume, de exemplu (8). *Enchytraeus albidus* se găsește în habitate marine, limnice și tericole, în special în materie organică aflată în descompunere (iarbă de mare, compost) și rareori în fânețe (42). Această toleranță ecologică mare și unele variații morfologice indică faptul că ar putea exista rase diferite ale acestei specii.

*Enchytraeus albidus* este disponibil în comerț, fiind vândut ca hrană pentru pești. Ar trebui verificat dacă cultura este contaminată cu alte specii, în general mai mici (60). În cazul în care apare contaminarea, toți viermii ar trebui spălați cu apă într-o cutie Petri. Specimenele adulte mari de *Enchytraeus albidus* sunt apoi selecționate (utilizând un stereomicroscop) pentru a iniția o nouă cultură. Toți ceilalți viermi sunt eliminați. Ciclul de viață al acestui vierme este scurt întrucât maturitatea este atinsă între 33 de zile (la 18 °C) și 74 de zile (la 12 °C). Numai culturile care au fost ținute în laborator timp de cel puțin 5 săptămâni (o generație) fără probleme ar trebui folosite pentru teste.

Sunt adecvate și alte genuri din specia *Enchytraeus*, mai ales *Enchytraeus luxuriosus*. Această specie este un adevărat locuitor al solului, care a fost descrisă de curând în (65). Dacă sunt folosite alte specii de *Enchytraeus*, acestea ar trebui să fie clar identificate și ar trebui raportată justificarea pentru selectarea speciei.

*Enchytraeus crypticus* (Westheide și Graefe, 1992) este o specie care aparține aceluiași grup ca și *Enchytraeus luxuriosus*. Nu s-a determinat cu certitudine existența acesteia în natură, specia fiind descrisă numai în culturile de răme și în grămezile de compost (Römbke 2003). Prin urmare, cerințele ecologice inițiale ale acesteia nu sunt cunoscute. Totuși, studii de laborator recente cu diferite soluri naturale au confirmat că această specie prezintă o toleranță ridicată la proprietățile solului, cum este pH-ul și textura (Jänsch *et al.* 2005). În ultimii ani, această specie a fost deseori folosită în studii ecotoxicologice datorită ușurinței înmulțirii și testării, de exemplu Kuperman *et al.* 2003. Totuși, această specie este mică [3-12 mm; în medie 7 mm (Westheide și Müller, 1996)], iar acest fapt face ca manipularea sa să fie mult mai dificilă comparativ cu *Enchytraeus albidus*. Când se folosește această specie în locul *Enchytraeus albidus*, dimensiunea vasului de testare poate fi mai mică, dar aceasta nu este o necesitate. În plus, ar trebui avut în vedere faptul că această specie se reproduce foarte rapid, timpul său de generare fiind mai mic de 20 de zile la 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999) și chiar mai rapid la temperaturi mai ridicate.

Enchitreidele din specia *Enchytraeus albidus* (precum și alte specii de *Enchytraeus*) pot fi înmulțite în cutii mari de plastic (de exemplu, 30 × 60 × 10 cm sau 20 × 12 × 8 cm, care este adecvată pentru creșterea viermilor de dimensiuni mici) umplute cu un amestec de sol artificial și de sol de grădină necontaminat, fără aditivi, disponibil în comerț. Trebuie evitată utilizarea compostului deoarece acesta poate conține substanțe chimice toxice, cum ar fi metale grele. Înainte de utilizare ar trebui eliminată fauna din solul pentru înmulțire prin trei congelări. De asemenea, poate fi utilizat și sol artificial, însă rata de reproducere ar putea fi mai lentă comparativ cu cea obținută în substraturile mixte. Substratul ar trebui să aibă un pH de 6,0 ± 0,5. Cultura se ține într-un incubator la temperatura de 15 ± 2 °C fără lumină. În orice caz, ar trebui evitată o temperatură mai mare de 23 °C. Solul artificial/natural ar trebui să fie umed, însă nu ud. Când solul este apăsător ușor cu mâna, ar trebui să apară numai mici picături de apă. În orice caz, ar trebui evitate condițiile anoxice (de exemplu, dacă se utilizează un capac, numărul de găuri din capac ar trebui să fie suficient de mare pentru a asigura într-o măsură suficientă schimbul de aer). Solul pentru înmulțire ar trebui să fie aerat, prin amestecare atentă, o dată pe săptămână.

▼ **M4**

Viermii ar trebui să fie hrăniți cel puțin o dată pe săptămână *ad libitum* cu fulgi de ovăz care sunt puși într-o cavitate în suprafața solului și acoperiți cu sol. Dacă în recipient rămâne hrană de la ultima dată de alimentare, cantitatea de hrană administrată ar trebui ajustată corespunzător. Dacă pe hrana rămasă se dezvoltă ciuperci, aceasta ar trebui înlocuită cu o nouă cantitate de fulgi de ovăz. Pentru a stimula reproducerea, fulgii de ovăz pot fi suplimentați, o dată la două săptămâni, cu pudră proteică disponibilă în comerț, îmbogățită cu vitamine. După trei luni, animalele sunt transferate într-un substrat de înmulțire sau de cultură proaspăt preparat. Fulgii de ovăz, care au fost ținuti în vase închise ermetic, ar trebui autoclavăți sau încălziți înainte de utilizare pentru a preveni infecțiile cu acarieni de făină (de exemplu, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) sau cu acarieni prădatori [e.g. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. După dezinfectare, hrana se macină astfel încât să poată fi presărată cu ușurință pe suprafața solului. O altă sursă de hrană posibilă este drojdia pentru panificație sau hrana pentru pești TetraMin®.

În general, condițiile de creștere sunt suficiente dacă viermii nu încearcă să părăsească substratul, se mișcă rapid prin sol, prezintă o suprafață exterioară lucioasă, fără particule de sol agățate de ea, sunt colorați mai mult sau mai puțin albișii și dacă viermii cu vârste diferite sunt vizibili. În fapt, se poate considera că viermii sunt sănătoși dacă se reproduc continuu.

#### Referințe bibliografice selecționate suplimentare

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römcke J. (2005), Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003), Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX, Pedobiologia 47: 651-656.

Römcke J. (2003), Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review, Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992), Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida), J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996), Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, Hydrobiologia 334: 263-267.

## ▼M6

**C.31. TEST PE PLANTĂ TERESTRĂ: TEST DE APARIȚIE A PLANTULELOR ȘI DE CREȘTERE A PLANTULELOR****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 208 (2006). Metodele de testare se revizuiesc periodic în lumina progreselor științifice și a aplicabilității în practica de reglementare. Prezenta metodă de testare actualizată are ca obiect evaluarea potențialelor efecte ale substanțelor chimice asupra apariției și creșterii plantulelor. Ea nu acoperă totuși efectele cronice sau efectele asupra reproducerii (adică formarea semințelor, formarea florilor, maturarea fructelor). Trebuie să se țină cont de condițiile de expunere și de proprietățile substanței chimice de testare pentru a asigura utilizarea unor metode de testare adecvate (de exemplu, atunci când se testează metale/compuși metalici, trebuie avute în vedere efectele de pH și ale contraionilor asociați) (1). Prezenta metodă de testare nu se aplică plantelor expuse la vapori de substanțe chimice. Ea se aplică testării substanțelor chimice generale, biocidelor și produselor de protecție a plantelor (cunoscute și sub denumirea de produse de uz fitosanitar sau de pesticide). Metoda a fost elaborată pe baza metodelor existente (2) (3) (4) (5) (6) (7). Au fost luate în considerare și alte referințe pertinente în materie de testare pe plante (8) (9) (10). Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

2. Testul evaluează efectele expunerii la substanța chimică de testare aflată în sol (sau altă matrice de sol adecvată) asupra apariției plantulelor și a începutului creșterii unor plante mai înalte. Semințele se pun în contact cu solul tratat cu substanța chimică de testare, iar efectele se evaluează în general după 14-21 de zile de la apariția a 50 % dintre plantulele din grupul de control. Punctele finale măsurate sunt evaluarea vizuală a apariției plantulelor, greutatea uscată a lăstarilor (sau greutatea în stare proaspătă a lăstarilor) și, în unele cazuri, înălțimea lăstarilor, precum și o evaluare a efectelor nocive vizibile pe diferite părți ale plantei. Aceste măsurători și observații se compară cu cele efectuate pe plante de control netratate.
3. În funcție de calea de expunere așteptată, substanța chimică de testare fie se încorporează în sol (sau eventual în matricea de sol artificial), fie se aplică pe suprafața solului, ceea ce reprezintă exact potențiala cale de expunere la substanța chimică. Încorporarea în sol se realizează prin tratarea solului brut. După aplicare, solul se transferă în vase, după care se plantează în sol semințele speciei de plantă date. Aplicarea pe suprafață se realizează pe solul din vase în care au fost plantate deja semințele. Unitățile de testare (probele de control și solurile tratate plus semințele) se plasează în condiții adecvate care să favorizeze germinarea/creșterea plantelor.
4. În funcție de obiectivul studiului, testul poate fi efectuat pentru a determina curba doză-răspuns sau poate fi efectuat la o concentrație/rată unică sub forma unui test la valori-limită. Dacă valorile rezultate în urma unui test la concentrație/rată unică depășesc un anumit nivel de toxicitate (de exemplu, atunci când se observă efecte mai mari decât x %), se realizează un test de stabilire a intervalului pentru a determina limitele superioare și inferioare ale toxicității, urmat de un test la mai multe concentrații/rate pentru a genera curba doză-răspuns. O analiză statistică adecvată permite calcularea unei concentrații efective  $EC_x$  sau a unei rate efective de aplicare  $ER_x$  (de exemplu  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ) pentru parametrul sau parametrii de interes cei mai sensibili. De asemenea, prezentul test permite calcularea valorilor pentru concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și pentru concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC).

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE**

5. Următoarele informații sunt utile pentru identificarea căii de expunere așteptate la substanța chimică și pentru proiectul testului: formula structurală, puritatea, solubilitatea în apă, solubilitatea în solvenți organici, coeficientul



**▼M6**

de partiție 1-octanol/apă, comportamentul de absorbție în sol, presiunea de vapori, stabilitatea chimică în apă și la lumină și biodegradabilitatea.

**VALIDITATEA TESTULUI**

6. Pentru ca testul să fie valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

- apariția plantulelor este de cel puțin 70 %;
- plantulele nu prezintă efecte fitotoxice vizibile (de exemplu cloroză, necroză, ofilire, deformări ale frunzelor și tulpinilor), iar plantele prezintă doar o variație normală a creșterii și morfologiei pentru respectiva specie;
- media de supraviețuire a plantulelor de control apărute este de cel puțin 90 % pe durata studiului;
- condițiile de mediu pentru o anumită specie sunt identice, iar mediile de cultură conțin aceeași cantitate de matrice de sol, mediu de susținere sau substrat din aceeași sursă.

**SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

7. O substanță chimică de referință poate fi testată la intervale regulate pentru a verifica dacă performanța testului și răspunsul plantelor de testare în cauză, precum și condițiile de testare nu s-au modificat semnificativ în timp. O altă opțiune ar fi utilizarea măsurătorilor anterioare ale biomasei și creșterii pentru a evalua performanța sistemului de testare, în special laboratoare, și poate servi ca măsură de control al calității intralaboratoare.

**DESCRIEREA METODEI****Sol natural – Substrat artificial**

8. Plantele pot fi cultivate în vase conținând lut nisipos, nisip lutos sau lut argilos-nisipos care conține până la 1,5 % carbon organic (aprox. 3 % materie organică). Se poate utiliza și pământ de ghiveci din comerț sau un amestec de sol sintetic care să conțină până la 1,5 % carbon organic. Solurile argiloase nu trebuie utilizate dacă se știe că substanța chimică de testat are o afinitate mare pentru argile. Solul natural trebuie cernut în particule de 2 mm pentru a-l omogeniza și a îndepărta particulele mari. Trebuie raportate tipul și textura, % de carbon organic, pH-ul și conținutul de sare drept conductivitate electronică a solului final preparat. Solul trebuie clasificat în conformitate cu o schemă de clasificare standard (11). Solul poate fi pasteurizat sau tratat termic pentru a reduce efectul patogenilor din sol.
9. Solul natural poate complica interpretarea rezultatelor și poate crește variabilitatea din cauza proprietăților fizice/chimice variate și a populațiilor microbiene. În schimb, aceste variabile modifică capacitatea de reținere a umidității, capacitatea de a crea legături chimice, aerarea și conținutul de nutrienți și oligoelemente. Pe lângă variația acestor factori fizici, va exista și o variație a proprietăților chimice cum ar fi pH-ul și potențialul redox, care poate afecta biodisponibilitatea substanței chimice de testare (12) (13) (14).
10. În general, substraturile artificiale nu se utilizează pentru testarea produselor de protecție a plantelor, dar pot fi utile pentru testarea de substanțe chimice generale sau atunci când se dorește să se reducă la minimum variabilitatea solurilor naturale și să se amelioreze comparabilitatea rezultatelor testului. Substraturile utilizate trebuie să fie compuse din materiale inerte care să reducă la minimum interacțiunea cu substanța chimică de testare, cu solventul purtător sau cu ambele. S-a demonstrat că nisipul cuarțos spălat

**▼ M6**

cu acid, lâna minerală și bilele de sticlă (de exemplu, cu diametru cuprins între 0,35 și 0,85 mm) reprezintă materiale inerte adecvate care absorb foarte puțin substanța chimică de testare (15), asigurând disponibilitatea maximală a substanței chimice pentru plantule prin absorbție radiculară. Printre substraturile necorespunzătoare se numără vermiculitul, perlitul sau alte materiale puternic absorbante. Aportul de nutrienți favorabili creșterii plantelor va asigura faptul că plantele nu sunt stresate din cauza carențelor nutritive și, dacă este posibil, acest lucru trebuie evaluat prin analize chimice sau prin inspecții vizuale ale plantelor de control.

**Criterii pentru selectarea speciei de testare**

11. Specia selectată trebuie să aibă o răspândire rezonabilă, de exemplu, având în vedere diversitatea taxonomică în regnul vegetal, distribuția, abundența, caracteristicile ciclului de viață specifice speciei și regiunea de ocurență naturală, pentru a dezvolta o serie de răspunsuri (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Pentru selectare, trebuie avute în vedere următoarele caracteristici ale posibilelor specii de testare:

- speciile au semințe uniforme care sunt ușor disponibile la surse de semințe standard fiabile și care produc o germinare regulată, fiabilă și uniformă, precum și o creștere uniformă a plantulelor;
- planta este adaptată la testele de laborator și poate genera rezultate fiabile și reproductibile în cadrul centrelor de testare și între centrele de testare;
- sensibilitatea speciei testate trebuie să corespundă răspunsurilor plantelor care se găsesc în mediul expus la substanța chimică;
- au fost utilizate într-o anumită măsură în teste anterioare de stabilire a toxicității, iar utilizarea lor, de exemplu, în teste biologice ale erbicidelor, depistarea metalelor grele, teste de stres salin sau mineral sau studii de alelopatie indică sensibilitatea la o gamă largă de agenți stresanți;
- sunt compatibile cu condițiile de creștere ale metodei de testare;
- îndeplinesc criteriile de validitate ale testului.

Unele dintre speciile de testare cele mai utilizate în trecut sunt enumerate în apendicele 2, iar eventualele specii necultivate sunt enumerate în apendicele 3.

12. Numărul de specii care trebuie testat depinde de cerințele de reglementare relevante și, prin urmare, nu este specificat în prezenta metodă de testare.

**Aplicarea substanței chimice de testare**

13. Substanța chimică trebuie aplicată într-un purtător adecvat (de exemplu, apă, acetonă, etanol, polietilenglicol, gumă arabică, nisip). Pot fi testate și amestecurile (produse formulate sau formule) care conțin ingrediente active și diverși adjuvanți.

*Încorporarea în sol/substratul artificial*

14. Substanțele chimice care sunt solubile în apă sau în suspensie în apă pot fi adăugate în apă, iar soluția se amestecă apoi cu sol, utilizând un dispozitiv de amestecare adecvat. Acest tip de test poate fi potrivit în cazul în care expunerea la substanța chimică se face prin sol sau apă interstițială din sol și dacă există riscuri de absorbție radiculară. Capacitatea solului de reținere a apei nu trebuie depășită prin adăugarea substanței chimice de testare. Volumul de apă adăugat trebuie să fie identic pentru fiecare concentrație de testare, însă trebuie să fie limitat pentru a împiedica aglomerarea solului.

▼ **M6**

15. Substanțele chimice cu solubilitate scăzută în apă trebuie dizolvate într-un solvent volatil adecvat (de exemplu acetonă, etanol) și amestecate cu nisip. Apoi solventul poate fi eliminat din nisip utilizând un curent de aer și amestecând continuu nisipul. Nisipul tratat se amestecă cu solul experimental. Se pregătește o a doua probă de control care trebuie să conțină numai nisip și solvent. La toate nivelurile de tratament și în a doua probă de control se adaugă cantități egale de nisip, cu solvent amestecat și eliminat. Pentru substanțele chimice de testare solide insolubile, se amestecă sol uscat cu substanța chimică utilizând un dispozitiv de amestecare adecvat. Ulterior, solul se adaugă în vase, iar semințele se plantează imediat.
16. Atunci când în loc de sol se utilizează substrat artificial, substanțele chimice care sunt solubile în apă pot fi dizolvate în soluția nutritivă chiar înainte de începerea testului. Substanțele chimice care nu sunt solubile în apă, dar care pot fi puse în suspensie în apă cu ajutorul unui solvent purtător trebuie adăugate împreună cu purtătorul în soluția nutritivă. Substanțele chimice insolubile în apă, pentru care nu există niciun purtător netoxic solubil în apă, trebuie dizolvate într-un solvent volatil adecvat. Soluția se amestecă cu nisip sau bile de sticlă, se introduce într-un aparat rotativ cu vacuum și se evaporă, lăsând un strat uniform de substanță chimică pe nisip sau pe bile. O parte cântărită de bile se extrage cu ajutorul aceluiași solvent organic, iar substanța chimică se analizează înainte de umplerea vaselor.

*Aplicarea la suprafață*

17. În cazul produselor de protecție a plantelor, aplicarea substanței chimice de testare se efectuează adesea prin pulverizarea suprafeței solului cu soluția de testare. Modelul și capacitatea tuturor echipamentelor utilizate pentru derularea testului, inclusiv ale echipamentelor utilizate pentru prepararea și administrarea substanței chimice de testare, trebuie să permită efectuarea cu precizie a testului și obținerea unei acoperiri reproductibile. Acoperirea trebuie să fie uniformă pe suprafețele de sol. Trebuie acordată atenție pentru a evita eventualele interacțiuni prin absorbție sau reacție dintre substanțele chimice și echipamente (de exemplu, tuburi de plastic și substanțe chimice lipofile sau piese și elemente din oțel). Substanța chimică de testare se pulverizează pe suprafața solului simulând aplicările obișnuite cu cisternă de pulverizare. În general volumele pulverizate trebuie să se încadreze în intervalul utilizat în practica agricolă obișnuită, iar aceste volume (cantitatea de apă etc.) trebuie raportate. Pentru a asigura o acoperire uniformă a suprafeței solului trebuie ales tipul de duză. Dacă se aplică solvenți și purtători, trebuie stabilit un al doilea grup de plante de control care să primească doar solventul/purtătorul. Acest lucru nu este necesar pentru produsele de protecție a plantelor care sunt testate sub formă de formule.

*Verificarea concentrației/ratei de substanță chimică de testare*

18. Concentrațiile/ratele de aplicare trebuie confirmate de o verificare analitică adecvată. Pentru substanțele chimice solubile, verificarea tuturor concentrațiilor/ratei de testare poate fi confirmată prin analiza soluției de testare având cea mai mare concentrație utilizată în cadrul testului cu documentația privind diluarea ulterioară și utilizarea de echipamente de aplicare calibrate (de exemplu, vase analitice calibrate din sticlă, calibrarea echipamentelor de aplicare prin pulverizare). Pentru substanțele chimice insolubile, verificarea materialului compus trebuie făcută cu greutatea de substanță chimică adăugată în sol. Dacă este necesară demonstrarea omogenității, poate fi necesară analiza solului.

**PROCEDURA****Proiectul testului**

19. Se plantează în vase semințe din aceeași specie. Numărul de semințe plantate în fiecare vas depinde de specie, de dimensiunea vasului și de durata testului. Numărul de plante din fiecare vas trebuie să asigure condiții de creștere adecvate și să evite aglomerarea pe durata testului. Densitatea maximă a

▼ **M6**

plantelor ar fi de aproximativ 3-10 semințe la 100 cm<sup>2</sup> în funcție de mărimea semințelor. De exemplu, se recomandă una sau două plante de porumb, soia, pătlăgea roșie, castravete sau sfeclă de zahăr la fiecare recipient de 15 cm, trei plante de rapiță sau mazăre la fiecare recipient de 15 cm și 5-10 plante de ceapă, grâu sau alte plante cu semințe mici la fiecare recipient de 15 cm. Numărul de semințe și de vase duplicat (duplicatul corespunde unui vas, prin urmare plantele din același vas nu constituie duplicate) ar trebui să fie adecvat pentru analiza statistică optimă (21). Trebuie remarcat faptul că variabilitatea va fi mai mare la speciile de testare care utilizează mai puține semințe mai mari în fiecare vas (duplicat) decât la speciile de testare unde este posibilă utilizarea unui număr mai mare de semințe mici în fiecare vas. Prin plantarea unui număr egal de semințe în fiecare vas această variabilitate poate fi redusă la minimum.

20. Grupurile de control se utilizează pentru a asigura faptul că efectele observate sunt asociate sau se atribuie numai expunerii la substanța chimică de testare. Grupul de control adecvat trebuie să fie identic din toate privințele cu grupul de testare, cu excepția expunerii la substanța chimică de testare. În cadrul unui test dat, toate plantele de testare, inclusiv probele de control, trebuie să provină din aceeași sursă. Pentru a preveni deviațiile, este necesară repartizarea aleatorie a vaselor de testare și a vaselor de control.
21. Trebuie evitate semințele acoperite de insecticid sau fungicid (adică semințe „îmbrăcate”). Cu toate acestea, utilizarea anumitor fungicide cu contact nesistemic (de exemplu captan, thiram) este permisă de unele autorități de reglementare (22). Dacă patogenii proveniți din semințe reprezintă o problemă, semințele trebuie înmuiate pentru scurt timp într-o soluție de hipoclorit slabă cu concentrație de 5 %, apoi clătite bine sub jet de apă și uscate. Nu se permite niciun alt tratament curativ cu alte produse de protecție a plantelor.

*Condițiile de testare*

22. Condițiile de testare trebuie să fie apropiate de condițiile necesare pentru creșterea normală a speciilor și soiurilor testate (în apendicele 4 sunt prezentate exemple de condiții de testare). Plantele emergente trebuie întreținute prin bune practici horticoale în camere, fitotroane sau sere cu mediu controlat. Când se utilizează instalații de cultivare, printre aceste practici se numără verificarea și consemnarea cu o frecvență adecvată (de exemplu zilnică) a temperaturii, umidității, concentrației de dioxid de carbon, luminii (intensitatea, lungimea unde, radiația activă fotosintetică) și a perioadei de lumină, mijloace de irigare etc. pentru a asigura o bună creștere a plantelor estimată prin observarea plantelor de control din specia selectată. Temperaturile din sere trebuie controlate prin sisteme de ventilare, încălzire și/sau răcire. Pentru testarea în sere se recomandă în general următoarele condiții:

- temperatură: 22 °C ± 10 °C;
- umiditate: 70 % ± 25 %;
- fotoperioadă: minimum 16 ore de lumină;
- intensitate luminoasă: 350 ± 50 μE/m<sup>2</sup>/s. Ar putea fi necesară o iluminare suplimentară în cazul în care intensitatea scade sub 200 μE/m<sup>2</sup>/s, lungime de undă de 400-700 nm, cu excepția anumitor specii pentru care cerințele de lumină sunt mai scăzute.

Condițiile de mediu trebuie monitorizate și raportate pe parcursul studiului. Plantele trebuie cultivate în vase din plastic neporos sau în vase emailate, cu o tavă sau farfurie dedesubt. Vasele pot fi reînlocuite periodic pentru a

▼ **M6**

reduce la minimum variabilitatea creșterii în rândul plantelor (din cauza diferenței condițiilor de testare din instalațiile de cultivare). Vasele trebuie să fie suficient de mari pentru a permite creșterea normală.

23. Pentru a menține o bună vigoare a plantelor, nutrienții solului pot fi suplimentați. Nevoia și momentul adăugării nutrienților suplimentari pot fi determinate prin observarea plantelor de control. Se recomandă alimentarea cu apă prin partea inferioară a recipientelor de testare (de exemplu utilizând meșe din fibră de sticlă). Cu toate acestea, se poate efectua o irigare inițială prin partea superioară pentru a stimula germinarea semințelor și, pentru aplicarea la suprafața solului, aceasta facilitează pătrunderea substanței chimice în sol.
24. Condițiile de cultivare specifice trebuie să fie adecvate pentru speciile testate și pentru substanța chimică de testare supusă studiului. Plantele de control și plantele tratate trebuie ținute în condiții de mediu identice. Cu toate acestea, trebuie luate măsuri adecvate pentru a împiedica expunerea încrucișată (de exemplu a substanțelor chimice volatile) între diferite tratamente și a probelor de control la substanța chimică de testare.

*Testarea la concentrație/rată unică*

25. Pentru a determina concentrația/rata adecvată de substanță chimică de testare pentru efectuarea unui test la concentrație/rată unică (de simulare/la valori-limită), trebuie avută în vedere o serie de factori. Pentru substanțele chimice generale, printre acești factori se numără proprietățile fizice/chimice ale substanței chimice. Pentru produsele de protecție a plantelor, trebuie avute în vedere proprietățile fizice/chimice și modelul de utilizare ale substanței chimice de testare, concentrația sau rata de aplicare maximă, numărul de aplicări pe sezon și/sau persistența substanței chimice de testat. Pentru a stabili dacă o substanță chimică generală prezintă proprietăți fitotoxice, ar putea fi adecvată testarea unui nivel maxim de 1 000 mg/kg de sol uscat.

*Testul de stabilire a intervalului*

26. Atunci când este necesar, se poate realiza un test de stabilire a intervalului pentru a furniza orientări privind concentrațiile/ratele care vor fi testate în cadrul studiului doză-răspuns final. Pentru testul de stabilire a intervalului, intervalele dintre concentrațiile/ratele de testare trebuie să fie mari (de exemplu 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg sol uscat). Pentru produsele de protecție a plantelor, concentrațiile/ratele ar putea fi bazate pe concentrația sau rata de aplicare recomandată sau maximă, de exemplu 1/100, 1/10, 1/1 din concentrația sau rata de aplicare recomandată/maximă.

*Testarea la mai multe concentrații/rate*

27. Scopul testului la mai multe concentrații/rate este de a stabili o relație doză-răspuns și de a determina o valoare  $EC_x$  sau  $ER_x$  legată de apariție, biomasă și/sau efectele vizuale în comparație cu probele de control neexpuse, conform cerințelor autorităților de reglementare.
28. Numărul de concentrații sau rate și intervalul dintre ele trebuie să fie suficiente pentru a genera o relație doză-răspuns și o ecuație de regresie fiabile și pentru a estima  $EC_x$  sau  $ER_x$ . Concentrațiile/ratele selectate trebuie să încadreze valorile  $EC_x$  sau  $ER_x$  care trebuie determinate. De exemplu, dacă este necesară o valoare  $EC_{50}$ , ar fi de preferat realizarea testului la rate care produc un efect cuprins între 20 și 80 %. Numărul recomandat de concentrații/rate de testare pentru a obține acest rezultat este de cel puțin cinci în serie geometrică plus proba de control netratată și distanțate de un factor de cel mult trei. Pentru fiecare grup suspus tratamentului și

**▼ M6**

fiecare grup de control, numărul de probe duplicat trebuie să fie de cel puțin patru, iar numărul total de semințe trebuie să fie de cel puțin 20. În cazul anumitor plante având o viteză scăzută de germinare sau caracteristici de creștere variabile, ar putea fi necesare mai multe probe duplicat pentru a crește puterea statistică a testului. Dacă se utilizează un număr mai mare de concentrații/rate de testare, numărul de probe duplicat poate fi redus. Dacă trebuie estimată NOEC, ar putea fi necesare mai multe probe duplicat pentru a obține puterea statistică dorită (23).

*Observații*

29. Pe parcursul perioadei de observație, adică 14-21 de zile de la apariția a 50 % dintre plantele de control (și a plantelor de control cu solvent, dacă este cazul), plantele se examinează frecvent (cel puțin săptămânal și, dacă este posibil, zilnic) pentru a observa apariția, fitotoxicitatea vizuală și mortalitatea. La finalul testului, se măsoară și se consemnează procentajul de apariție și biomasa plantelor supraviețuitoare, precum și efectele nocive vizibile asupra diferitor părți ale plantei. Printre efectele nocive se numără anomaliile legate de aspectul plantulelor apărute, oprirea din creștere, cloroza, decolorarea, mortalitatea și efectele asupra dezvoltării plantelor. Biomasa finală poate fi măsurată utilizând greutatea uscată medie finală a lăstarilor plantelor supraviețuitoare, prin recoltarea lăstarilor de la suprafața solului și uscarea lor până la obținerea unei greutăți constante la 60 °C. Alternativ, biomasa finală se poate măsura utilizând greutatea în stare proaspătă a lăstarilor. Înălțimea lăstarilor poate reprezenta un alt punct final, dacă acest lucru este solicitat de autoritățile de reglementare. Pentru a evalua răspunsurile toxice observabile, ar trebui utilizat un sistem de notare uniformă a leziunilor vizibile. Exemple de efectuare a evaluărilor vizuale calitative și cantitative sunt furnizate în referințele (23) (24).

**DATE ȘI RAPORT****Analiza statistică***Testul la concentrație/rată unică*

30. Datele pentru fiecare specie de plante trebuie analizate cu ajutorul unei metode statistice adecvate (21). Trebuie să se raporteze nivelul efectului la concentrația/rata de testare sau incapacitatea de a obține un efect dat la concentrația/rata de testare (de exemplu  $<x$  % efect observat la concentrația sau rata  $y$ ).

*Testul la mai multe concentrații/rate*

31. O relație doză-răspuns se stabilește pe baza unei ecuații de regresie. Pot fi utilizate diferite modele: de exemplu, pentru estimarea  $EC_x$  sau  $ER_x$  (de exemplu  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ) și a limitelor lor de încredere pentru apariție sub formă de date binare, pot fi adecvate metodele logit, probit, Weibull, Spearman-Kärber, Spearman-Kärber simplificată. Creșterea plantulelor (greutate sau înălțime) ca puncte finale continue  $EC_x$  sau  $ER_x$  și limitele sale de încredere pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată [de exemplu analiza de regresie neliniară Bruce-Versteeg (25)]. În măsura posibilului,  $R^2$  trebuie să fie 0,7 sau mai mare pentru speciile cele mai sensibile, iar concentrațiile/ratele de testare cuprind efectele de la 20 % la 80 %. Dacă trebuie estimată NOEC, este de preferat aplicarea unor teste statistice puternice, care trebuie selectate pe baza distribuției datelor (21) (26).

**Raportul de testare**

32. Raportul de testare trebuie să prezinte rezultatele studiilor, precum și o descriere detaliată a condițiilor de testare, o discuție amplă a rezultatelor, analiza datelor și concluziile trase din analiză. Trebuie furnizate un rezumat sub formă de tabel și o sinteză a rezultatelor. Raportul trebuie să includă următoarele:

**▼ M6***Substanța chimică de testare:*

- datele de identificare a substanței chimice, proprietățile relevante ale substanței chimice testate (de exemplu  $\log P_{ow}$ , solubilitatea în apă, presiunea de vapori și informații privind evoluția și comportamentul în mediu, dacă sunt disponibile);
- detalii privind prepararea soluției de testare și verificarea concentrațiilor de testare, astfel cum se specifică la punctul 18.

*Speciile de testare:*

- detalii privind organismul de testare: specia/soiul, familia de plante, denumirile științifice și comune, istoricul seminței cât mai detaliat posibil (adică numele furnizorului, procentajul de germinare, clasa de mărime a seminței, numărul seriei sau lotului, anul seminței sau sezonul de creștere în care a fost colectată, data evaluării germinării), fiabilitatea etc.;
- numărul de specii monocotiledonate și dicotiledonate testate;
- argumentarea alegerii speciei;
- descrierea depozitării, tratării și întreținerii semințelor.

*Condițiile de testare:*

- instalația de testare (de exemplu, cameră de cultivare, fitotron și seră);
- descrierea sistemului de testare (de exemplu, dimensiunile vaselor, materialul vaselor și cantitățile de sol);
- caracteristicile solului (textura sau tipul solului, distribuția și clasificarea particulelor de sol, proprietățile fizice și chimice, inclusiv % de materie organică, % de carbon organic și pH-ul)
- prepararea solului/substratului (de exemplu, sol, sol artificial, nisip și altele) înainte de test;
- descrierea mediului nutritiv, dacă a fost utilizat;
- aplicarea substanței chimice de testare: descrierea metodei de aplicare, descrierea echipamentelor, procentajele de expunere și volumele, inclusiv verificarea substanței chimice, descrierea metodei de calibrare și descrierea condițiilor de mediu în timpul aplicării;
- condițiile de creștere: intensitatea luminoasă (de exemplu RAF, radiația activă fotosintetică), fotoperioda, temperaturile max./min., programul și metoda de irigare, fertilizarea;
- numărul de semințe din fiecare vas, numărul de plante per doză, numărul de duplicate (vase) per rată de expunere;
- tipul și numărul de probe de control (probe de control negative și/sau pozitive, probe de control cu solvent, dacă au fost utilizate);
- durata testului.

*Rezultate:*

- tabel cu toate punctele finale pentru fiecare duplicat, concentrația/rata de testare și specia;
- numărul și procentajul de apariție în comparație cu probele de control;
- măsurătorile biomasei (greutatea uscată și greutatea în stare proaspătă a lăstarilor) plantelor sub formă de procentaj din probele de control;

**▼ M6**

- înălțimea lăstarilor plantei sub formă de procentaj din probele de control, dacă a fost măsurată;
- procentajul de leziuni vizuale și descrierea calitativă și cantitativă a leziunilor vizuale (cloroză, necroză, ofilire, deformarea frunzelor și tulpinilor, precum și orice lipsă a efectelor) provocate de substanța chimică de testare în comparație cu plantele de control;
- descrierea scalei de evaluare utilizate pentru aprecierea leziunilor vizuale, dacă se furnizează o evaluare vizuală;
- pentru studiile la rată unică, procentajul de leziuni trebuie raportat;
- valorile  $EC_x$  sau  $ER_x$  (de exemplu  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ,  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ) și limitele de încredere aferente. Dacă se efectuează o analiză a regresiei, trebuie furnizate eroarea standard pentru ecuația de regresie și eroarea standard pentru estimarea parametrilor individuali (de exemplu pantă, intercepție);
- valorile NOEC (și LOEC), dacă au fost calculate;
- descrierea procedurilor statistice și a ipotezelor utilizate;
- reprezentarea grafică a acestor date și a relației doză-răspuns pentru specia testată.

Abaterile de la procedurile descrise în cadrul prezentei metode de testare și toate evenimentele neobișnuite din timpul testului.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Schrader G., Metge K., și Bahadır M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.
- (3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
  - 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;
  - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;
  - 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
  - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
  - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
  - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. și Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.



▼ **M6**

- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., și Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., și Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr. și Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. și Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174
- (17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C. și Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) Boutin, C. și Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. și Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OCDE (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (22) Hatzios, K.K. și Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. și G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.
- (24) Frans, R.E. și Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2<sup>nd</sup> ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D. și Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.
- (26) Capitolul C.33 al prezentei anexe: Test de reproducere a râmelor (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții**

„**Ingredient activ (i.a.) [sau substanță activă (s.a.)]**” înseamnă un material destinat să exercite un anumit efect biologic (de exemplu, controlul insectelor, controlul bolilor plantelor, controlul buruienilor în zona tratată), cunoscut și ca ingredient activ sau substanță activă de puritate tehnică.

„**Substanță chimică**” înseamnă o substanță sau un amestec.

„**Produse de protecție a plantelor ori produse de uz fitosanitar sau pesticide**” înseamnă materiale cu o anumită activitate biologică utilizate intenționat pentru protejarea culturilor împotriva dăunătorilor (de exemplu, boli criptogamice, insecte și plante competitive).

„**EC<sub>x</sub>, concentrația efectivă x % sau ER<sub>x</sub>, rata efectivă x %**” înseamnă concentrația sau rata care are ca rezultat o schimbare sau o modificare nedorită de x % din punctul final de testare măsurat în raport cu proba de control (de exemplu reducerea cu 25 % sau 50 % a apariției plantulelor, a greutateii lăstarilor, a numărului final de plante prezente sau creșterea leziunilor vizuale constituie o EC<sub>25</sub>/ER<sub>25</sub> sau, respectiv, o EC<sub>50</sub>/ER<sub>50</sub>).

„**Apariție**” înseamnă apariția coleoptilului sau a cotiledonului deasupra suprafeței solului.

„**Formulă**” înseamnă produsul formulat comercial care conține substanța activă (ingredientul activ), cunoscut și sub denumirea de preparat final<sup>(1)</sup> sau produs final tipic.

„**LOEC (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect)**” înseamnă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare pentru care este observat un efect. În prezentul test, concentrația corespunzătoare LOEC are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control și este mai mare decât valoarea NOEC.

„**Plante nevizate**” înseamnă plantele care se află în afara zonei unde se află plantele vizate. Pentru produsele de protecție a plantelor, acest termen se referă în general la plantele care se află în afara zonei supuse tratamentului.

„**NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect)**” înseamnă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare la care nu se observă niciun efect. În prezentul test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„**Fitotoxicitate**” înseamnă devieri nocive (conform evaluărilor măsurate și vizuale) de la aspectul și creșterea normale ale plantelor ca răspuns la o substanță chimică dată.

„**Duplicat**” înseamnă unitatea experimentală care reprezintă grupul de control și/sau grupul supus tratamentului. În prezentele studii, duplicatul este reprezentat de un vas.

„**Evaluare vizuală**” înseamnă evaluarea defectelor vizuale pe baza observațiilor privind postura, vigoarea, malformațiile, cloroza, necroza și aspectul general al plantei în comparație cu o plantă de control.

„**Substanță chimică de testare**” orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

<sup>(1)</sup> Preparat final: Produsul formulat care conține substanța chimică activă (ingredientul activ) vândut în comerț.

▼ **M6**

## Apendicele 2

## Listă de specii utilizate în trecut în testele pe plante

| Familia                   | Specia  | Denumirea comună  |
|---------------------------|---|---|
| <i>DICOTYLEDONAE</i>      |   |   |
| Apiaceae (Umbelliferae)   | <i>Daucus carota</i>                                | Morcov  |
| Asteraceae (Compositae)   | <i>Helianthus annuus</i>                            | Floarea-soarelui  |
| Asteraceae (Compositae)   | <i>Lactuca sativa</i>                               | Salată verde  |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Sinapis alba</i>                                 | Muștar alb  |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica campestris</i><br>var. <i>chinensis</i> | Varză chinezească   |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica napus</i>                               | Rapiță  |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica oleracea</i><br>var. <i>capitata</i>    | Varză   |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica rapa</i>                                | Nap   |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Lepidium sativum</i>                             | Creson de grădină   |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Raphanus sativus</i>                             | Ridiche   |
| Chenopodiaceae            | <i>Beta vulgaris</i>                                | Sfeclă de zahăr   |
| Cucurbitaceae             | <i>Cucumis sativus</i>                              | Castravete  |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Glycine max (G. soja)</i>                        | Soia  |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Phaseolus aureus</i>                             | Fasole mung   |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Phaseolus vulgaris</i>                           | Fasole pitică, fasole<br>franțuzească, fasole de<br>grădină |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Pisum sativum</i>                                | Mazăre  |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Trigonella foenum-<br/>graecum</i>               | Schinduf  |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Lotus corniculatus</i>                           | Ghizdei   |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Trifolium pratense</i>                           | Trifoi roșu   |
| Fabaceae (Leguminosae)    | <i>Vicia sativa</i>                                 | Măzărice  |
| Linaceae                  | <i>Linum usitatissimum</i>                          | In  |
| Polygonaceae              | <i>Fagopyrum esculentum</i>                         | Hrișcă  |
| Solanaceae                | <i>Solanum lycopersicon</i>                         | Pătlăgea roșie  |

▼ **M6**

| Familia                         | Specia                   | Denumirea comună |
|---------------------------------|--------------------------|------------------|
| <i>MONOCOTYLEDONAE</i>          |                          |                  |
| Liliaceae (Amaryllada-<br>ceae) | <i>Allium cepa</i>       | Ceapă            |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Avena sativa</i>      | Ovăz             |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Hordeum vulgare</i>   | Orz              |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Lolium perenne</i>    | Zizanie          |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Oryza sativa</i>      | Orez             |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Secale cereale</i>    | Secară           |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Sorghum bicolor</i>   | Sorg             |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Triticum aestivum</i> | Grâu             |
| Poaceae (Gramineae)             | <i>Zea mays</i>          | Porumb           |

## Listă de specii necultivate potențiale

## Specii potențiale potrivit OCDE pentru testarea toxicității la plante

*Notă:* Tabelul următor pune la dispoziție informații pentru 52 de specii necultivate (referințele sunt prezentate între paranteze pentru fiecare intrare). Ratele de apariție furnizate sunt extrase din literatura de specialitate publicată și sunt puse la dispoziție doar cu titlu de orientare generală. Experiența individuală poate varia în funcție de sursa semințelor și de alți factori.

| FAMILIA Denumirea botanică a speciei<br>(denumirea comună în română)   | Durata de viață <sup>(1)</sup> și habitatul                   | Greutatea seminței (mg) | Fotoperioada pentru germinare sau creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de plantare (mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de germinare (zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>  | Test de toxicitate <sup>(6)</sup> | Furnizori de semințe <sup>(7)</sup> | Alte referințe <sup>(8)</sup> |
|--|---|-------------------------|---|---|---|---|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <b>APIACEAE</b><br><i>Torilis japonica</i><br>(Hațmațuchiul măgarului) | A, B zone perturbate, marginea tufișurilor, pășuni (16, 19)   | 1,7-1,9 (14, 19)        | L = D (14)  | 0 (1, 19)                                 | 5 (50 %) (19)                             | stratificare rece (7, 14, 18, 19) maturarea poate fi necesară (19) germinare inhibată de întuneric (1, 19) niciun tratament special (5) | POST (5)                          |                                     |                               |
| <b>ASTERACEAE</b><br><i>Bellis perennis</i><br>(Păraluță)              | P<br>pășuni și fânețe, terenuri arabile, peluze (16, 19)      | 0,09-0,17 (4, 19)       | L = D (14)  | 0 (4)                                     | 3 (50 %) (19)<br>11 (100 %) (18)          | germinare neafectată de iradiație (18, 19) fără tratamente speciale (4, 14)   | POST (4)                          | A, D, F                             | 7                             |
| <i>Centaurea cyanus</i><br>(Albăstrea)                                 | A<br>câmpuri, marginea drumurilor, habitate deschise (16)     | 4,1-4,9 (4, 14)         | L = D (14)  | 0-3 (2, 4, 14)                            | 14-21 (100 %) (14)                        | fără tratamente speciale (2, 4)   | POST (2,4)                        | A, D, E, F                          | 7                             |
| <i>Centaurea nigra</i><br>(Țintaură)                                   | P<br>câmpuri, marginea drumurilor, habitate deschise (16, 19) | 2,4-2,6 (14, 19)        | L = D (14)  | 0 (19)                                    | 3 (50 %) (19)<br>4 (97 %) (18)            | maturarea poate fi necesară (18, 19) germinare inhibată de întuneric (19) fără tratamente speciale (5, 14, 26)                          | POST (5, 22, 26)                  | A                                   |                               |
| <i>Inula helenium</i><br>(Iarbă mare)                                  | P<br>locuri umede, perturbate (16)                            | 1-1,3 (4, 14, 29)       |   | 0 (4, 29)                                 |   | fără tratamente speciale (4)  | POST (4)                          | A, F                                |                               |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                    | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>  | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|---|--|--|------------------------------------|
| <i>Leontodon hispidus</i><br>(Potcapul-călugărului)                     | P<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor, zone<br>perturbate (16, 19) | 0,85 -1,2<br>(14, 19)         | L = D (14)   | 0 (19)  | 4 (50 %) (19)<br>7 (80 %) (18)                  | germinare inhibată de<br>întuneric (17, 18, 19) fără<br>tratamente speciale (5, 23)   | POST (5, 22,<br>23)                    |  |                                    |
| <i>Rudbeckia hirta</i><br>(Pălăria soarelui)                            | B, P perturbat<br>(16)  | 0,3 (4, 14)                   | L = D (14)   | 0<br>(4, 33)                                    | < 10 (100 %) (33)                               | fără tratamente speciale<br>(4, 14, 33)   | POST (4, 33)                           | C, D, E, F                             |                                    |
| <i>Solidago canadensis</i><br>(Sânziană)                                | P<br>pășuni, zone<br>deschise (16)                                | 0,06-0,08<br>(4, 14)          | L = D (11)   | 0<br>(4)  | 14-21<br>(11)                                   | se amestecă cu o parte egală<br>de nisip și se înmoaie în<br>500ppm de GA timp de 24<br>de ore (11) fără tratamente<br>speciale (4) | POST (4)                               | E, F                                   |                                    |
| <i>Xanthium pensylvanicum</i><br>(Scaiete comun)                        | A<br>câmpuri, habitate<br>deschise (16)                           | 25-61 (14, 29)                |  | 0(1)<br>5(29)                                   |   | germinarea poate fi inhibată<br>de întuneric (1) se înmoaie<br>în apă caldă timp de 12 ore<br>(29)                                  | PRE și POST<br>(31)                    | A                                      |                                    |
| <i>Xanthium spinosum</i><br>(Ghimpe)                                    | A<br>habitate deschise<br>(16)                                    | 200 (14)                      | L = D (14)<br>L > D (6)  | 10<br>(6)                                       |   | scarificare (14) fără<br>tratamente speciale (6)  | PRE și POST<br>(6)                     | A                                      |                                    |
| <i>Xanthium strumarium</i><br>(Scaietele popii)                         | A<br>câmpuri, habitate<br>deschise (16)                           | 67,4 (14)                     | L = D (14)   | 10-20 (6, 21)                                   |   | fără tratamente speciale<br>(6, 14, 21)   | PRE și POST<br>(6, 21, 28, 31)         | A                                      |                                    |
| <b>BRASSICACEAE</b><br><i>Cardamine pratensis</i><br>(Stupitul-cucului) | P<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor, peluze<br>(16, 19)          | 0,6 (14, 19)                  | L = D (14)   | 0 (19)  | 5 (50 %) (19)<br>15 (98 %) (18)                 | germinare inhibată de<br>întuneric (18, 19) fără<br>tratamente speciale (5, 14,<br>22)  | POST (5, 22)                           | F                                      |                                    |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română)   | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                                 | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|--|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <b>CARYOPHYLLACEAE</b><br><i>Lychnis flos-cuculi</i><br>(Floarea-cucului) | P<br>(16)  | 0,21 (14)                     | L = D (14)   |   | < 14 (100 %) (14, 25)                           | maturarea poate fi necesară (18) fără tratamente speciale (5, 14, 15, 22-26)   | POST (5, 15, 22-26)                    | F                                      |                                    |
| <b>CHENOPODIACEAE</b><br><i>Chenopodium album</i><br>(Spanac sălbatic)    | A<br>marginea câmpu-<br>rilor, zone<br>perturbate (16, 19)                     | 0,7-1,5 (14,<br>19, 34)       | L = D (14)   | 0<br>(1, 19)                                    | 2 (50 %) (19)                                   | tratamentul diferă în funcție de culoarea semințelor (19) stagnarea creșterii în depozitare uscată (19) germinare inhibată de întuneric (1, 18, 19) stratificare rece (18) fără tratamente speciale (14, 34) | PRE și POST (28, 31, 34)               | A                                      | 32                                 |
| <b>CLUSIACEAE</b><br><i>Hypericum perforatum</i><br>(Sunătoare)           | P<br>câmpuri, terenuri<br>arabile, habitate<br>deschise (16, 19)               | 0,1-0,23<br>(14, 19)          | L= D<br>(14)   | 0<br>(1, 19)                                    | 3 (19)<br>11 (90 %) (18)                        | germinare inhibată de întuneric (1, 18, 19) fără tratamente speciale (5, 14, 15, 25, 27)   | POST<br>(5, 15, 25, 27)                | A, E, F                                |                                    |
| <b>CONVOLVULACEAE</b><br><i>Ipomoea hederacea</i><br>(Rochița-rândunicii) | A<br>marginea drumu-<br>rilor, habitate<br>deschise, lanuri de<br>porumb (16)  | 28,2<br>(14)                  | L > D<br>(6, 10)   | 10-20<br>(6, 10, 21)                            | 4 (100 %) (10)                                  | germinare neafectată de iradiație (1) fără tratamente speciale (6, 21)   | PRE și POST<br>(6, 12, 21, 28)         | A                                      |                                    |
| <b>CYPERACEAE</b><br><i>Cyperus rotundus</i><br>(Căprișor)                | P<br>terenuri arabile,<br>pășuni, marginea<br>drumurilor (16, 30)              | 0,2<br>(14)                   | L= D<br>(14)   | 0 (1)<br>10-20 (6, 10)                          | 12 (91 %) (10)                                  | germinare inhibată de întuneric (1) fără tratamente speciale (6, 10, 14)   | PRE și POST<br>(6, 28, 31)             | B                                      | 7                                  |
| <b>FABACEAE</b><br><i>Lotus corniculatus</i><br>(Ghizdei)                 | P<br>zone ierboase,<br>marginea drumu-<br>rilor, habitate<br>deschise (16, 19) | 1-1,67<br>(14, 19)            | L = D (14)   |   | 1 (50 %) (19)                                   | scarificare (14, 19) germinare neafectată de iradiație (18, 19) fără tratamente speciale (23, 25)  | POST<br>(5, 23, 25)                    | A, D, E, F                             |                                    |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                     | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>  | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|--|-------------------------------|--|---|---|---|--|--|------------------------------------|
| <i>Senna obtusifolia</i><br>(Senna chinezească)                         | A<br>păduri umede (16)   | 23-28<br>(9)                  | L = D (14)<br>L > D (9)  | 10-20<br>(6,9)                                  |   | semințele se înmoaie în apă<br>timp de 24 de ore (9)<br>scarificare (14) viabilitatea<br>semințelor diferă în funcție<br>de culoare (1) fără<br>tratamente speciale (6) | POST<br>(6,9)                          | A                                      |                                    |
| <i>Sesbania exaltata</i><br>(Câneapă)                                   | A<br>sol aluvial (16)  | 11-13<br>(9, 14)              | L > D (9)  | 10-20<br>(9, 21)                                |   | semințele se înmoaie în apă<br>timp de 24 de ore (9)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (1) fără tratamente<br>speciale (21)                                       | PRE și POST<br>(9, 21, 28, 31)         | A                                      |                                    |
| <i>Trifolium pratense</i><br>(Trifoi roșu)                              | P<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor, terenuri<br>arabile (16, 19) | 1,4-1,7<br>(14, 19)           | L= D (14)  |   | 1 (50 %)<br>(19)                                | scarificare (14, 18)<br>poate necesita maturare (19)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (1, 19) fără<br>tratamente speciale (5)                                    | POST<br>(5)                            | A, E, F                                |                                    |
| <b>LAMIACEAE</b><br><i>Leonurus cardiaca</i><br>(Talpa-gâștei)          | P<br>zone deschise (16)  | 0,75-1,0<br>(4, 14)           | L= D (14)  | 0<br>(4)  |   | fără tratamente speciale<br>(4, 14)   | POST<br>(4)                            | F                                      |                                    |
| <i>Mentha spicata</i><br>(Mentă comună)                                 | P<br>zone umede (16)   | 2,21<br>(4)                   |  | 0<br>(4)  |   | fără tratamente speciale<br>(4)   | POST<br>(4)                            | F                                      |                                    |
| <i>Nepeta cataria</i><br>(Cătușnică)                                    | P<br>zone perturbate (16)  | 0,54<br>(4, 14)               | L= D (14)  | 0<br>(4)  |   | fără tratamente speciale<br>(2, 4, 14)  | POST<br>(2,4)                          | F                                      |                                    |



## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                            | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <i>Prunella vulgaris</i><br>(Busuioc-sălbatic)                          | P<br>terenuri arabile,<br>zone ierboase,<br>locuri perturbate<br>(16, 19) | 0,58-1,2<br>(4, 14, 19)       | L= D (14)  | 0<br>(4, 19)                                    | 5 (50 %) (19)<br>7 (91 %) (18)                  | germinare inhibată de<br>întuneric (18, 19)<br>germinare mai bună cu<br>semințe mai mari (1 ) fără<br>tratamente speciale (4, 14,<br>22)                               | POST<br>(4, 22)                        | A, F                                   |                                    |
| <i>Stachys officinalis</i><br>(Vindecea)                                | P<br>pășuni și fânețe,<br>marginea<br>câmpurilor (19)                     | 14-18<br>(14, 19)             | L= D (14)  |   | 7 (50 %) (19)                                   | fără tratamente speciale<br>(5, 14, 22)  | POST<br>(5, 22)                        | F                                      |                                    |
| <b>MALVACEAE</b><br><i>Abutilon theophrasti</i><br>(Pistolnic)          | A<br>câmpuri, habitate<br>deschise (16)                                   | 8,8<br>(14)                   | L= D (14)  | 10-20<br>(6, 10, 21)                            | 4 (84 %) (10)                                   | scarificare (14)<br>fără tratamente speciale (5,<br>10, 21)  | PRE și POST<br>(6, 22, 28, 31)         | A, F                                   |                                    |
| <i>Sida spinosa</i><br>(Sida spinoasă)                                  | A<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor (16)                                 | 3,8<br>(14)                   | L= D (14)  | 10-20<br>(6, 21)                                |   | scarificare (14)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (1) fără tratamente<br>speciale (6, 21 )  | PRE și POST<br>(6, 21, 28, 31)         | A, F                                   |                                    |
| <b>PAPAVERACEAE</b><br><i>Papaver rhoeas</i><br>(Mac)                   | A<br>câmpuri, terenuri<br>arabile, locuri<br>perturbate (16, 19)          | 0,1-0,3<br>(4, 14, 19, 29)    | L= D (14)  | 0<br>(4, 29)                                    | 4 (50 %) (19)                                   | stratificare rece și scarificare<br>(1, 19, 32)<br>fără tratamente speciale (4,<br>14, 29)   | POST<br>(4)                            | A, D, E, F, G                          |                                    |
| <b>POACEAE</b><br><i>Agrostis tenuis</i><br>(Păiuș)                     | peluze, pășuni (16)   | 0,07 (14)                     | L > D (10)   | 20 (10)   | 10 (62 %) (10)                                  | germinare inhibată de<br>întuneric (1, 17-19) fără<br>tratamente speciale (10)   | POST (10)                              | A, E                                   |                                    |
| <i>Alopecurus myosuroides</i><br>(Coadă-vulpiei)                        | A<br>câmpuri, habitate<br>deschise (16)                                   | 0,9-1,6<br>(29, 34)           | L = D (14)   | 2<br>(29)                                       | < 24 (30 %) (34)                                | scarificare (14) se tratează<br>cu 101 mg/l KNO <sub>3</sub> (14)<br>stratificare caldă (1)<br>germinare inhibată de<br>întuneric (1) fără tratamente<br>speciale (34) | PRE și POST<br>(28, 34)                | A                                      | 32                                 |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                      | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <i>Avena fatua</i><br>(Ovăz sălbatic)                                   | A<br>zone cultivate,<br>habitate deschise<br>(16)                   | 7-37,5<br>(14, 30)            | L = D (14)<br>L > D (6)  | 10-20 (6, 10)                                   | 3 (70 %) (18)                                   | scarificare (7, 32) întunericul<br>inhibă germinarea (1)<br>stratificare rece (1, 18) fără<br>tratamente speciale (6, 10,<br>14)   | PRE și POST<br>(6, 10, 28, 31)         | A                                      |                                    |
| <i>Bromus tectorum</i><br>(Obsigă)                                      | A<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor, terenuri<br>arabile (16)      | 0,45-2,28<br>(14, 29)         | L = D (14)   | 3 (29)  |   | perioadă de maturare (1, 7,<br>32) germinare inhibată de<br>lumină (1) fără tratamente<br>speciale (14)  | PRE și POST<br>(28, 31)                | A                                      |                                    |
| <i>Cynosurus cristatus</i><br>(Pieptănariță)                            | P<br>câmpuri, marginea<br>drumurilor, habitate<br>deschise (16, 19) | 0,5-0,7 (14,<br>19, 29)       | L = D (14)   | 0 (29)  | 3 (50 %) (19)                                   | germinare neafectată de<br>iradiație (19) fără tratamente<br>speciale (14, 29)   | POST (5)                               | A                                      |                                    |
| <i>Digitaria sanguinalis</i><br>(Rouriță sanguinee)                     | A<br>câmpuri, peluze,<br>habitate deschise<br>(16)                  | 0,52-0,6<br>(14, 30)          | L = D (14)   | 10-20 (21)                                      | 7 (75 %)<br>14 (94 %) (7)                       | scarificare, stratificare rece<br>și maturare (1, 7, 14, 32)<br>se tratează cu 101 mg/l<br>KNO <sub>3</sub> (14) germinare<br>inhibată de întuneric (1)<br>fără tratamente speciale (21) | PRE și POST<br>(18, 25, 31)            | A                                      |                                    |
| <i>Echinochloa crusgalli</i><br>(Costrei)                               | A<br>(16)   | 1,5 (14)                      | L = D (14)<br>L > D (3)  | 10-20 (7, 21)                                   |   | scarificare (7, 32) germinare<br>neafectată de iradiație (1)<br>fără tratamente speciale (3,<br>14, 21)  | PRE și POST<br>(3, 21, 28, 31)         | A                                      |                                    |
| <i>Elymus canadensis</i><br>(Orzișor canadian)                          | P<br>riveran, locuri<br>perturbate (16)                             | 4-5 (14, 30)                  | L = D (11)   | 1<br>(11)                                       | 14-28<br>(11)                                   | fără tratamente speciale<br>(2, 11)  | POST (2)                               | C, D, E                                |                                    |
| <i>Festuca pratensis</i><br>(Păiuș)                                     | P<br>câmpuri, zone<br>umede (16, 19)                                | 1,53-2,2<br>(16, 19)          | L = D (14)<br>L > D (10)   | 20 (10)   | 9 (74 %) (10)<br>2 (50 %) (19)                  | fără tratamente speciale<br>(10, 19)   | POST (10)                              | A                                      | 7                                  |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română)   | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                  | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <i>Hordeum pusillum</i><br>(Orz pitic)                                    | A<br>pășuni, marginea<br>drumurilor, habitate<br>deschise (16)  | 3,28 (14)                     |  |   |   | stratificare caldă (1)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (1)   | PRE (31)                               |  | 7                                  |
| <i>Phieum pratense</i><br>(Timofitică)                                    | P<br>pășuni, terenuri<br>arabile, locuri<br>perturbate (16, 19) | 0,45 (14, 19)                 | L > D (10,<br>14)  | 0-10 (10, 19)                                   | 2 (74 %) (10)<br>8 (50 %) (19)                  | germinare inhibată de<br>întuneric (19) germinare<br>neafectată de iradiație (17)<br>fără tratamente speciale (10,<br>14, 17, 19)  | POST (10)                              | A, E                                   |                                    |
| <b>POLYGONACEAE</b><br><i>Polygonum convolvulus</i><br>(Hrișcă urcătoare) | A<br>habitate deschise,<br>marginea<br>drumurilor (16)          | 5-8<br>(4, 14, 29)            | L = D (20)   | 0-2 (4, 29)                                     |   | stratificare rece timp de 4-8<br>săptămâni (1, 2, 4, 20, 29)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (1)   | PRE și POST 1,<br>2, 20, 28, 31        | A                                      | 32                                 |
| <i>Polygonum lapathifolium</i><br>(Iarbă roșie)                           | A<br>sol umed (16)  | 1,8-2,5 (14)                  | L > D (6)  |   | 5 (94 %) (18)                                   | germinare neafectată de<br>iradiație (1) germinare<br>inhibată de întuneric (18)<br>stratificare rece (1) fără<br>tratamente speciale (5)                                    | PRE și POST<br>(6)                     | A, E                                   |                                    |
| <i>Polygonum pennsylvanicum</i><br>(Troscot de Pennsylvania)              | A<br>câmpuri, habitate<br>deschise (16)                         | 3,6-7 (14, 29)                |  | 2 (29)  |   | stratificare rece timp de 4<br>săpt. la 0-5 °C (1, 29)<br>germinare inhibată de<br>întuneric (1)   | PRE (31)                               | A, E                                   |                                    |
| <i>Polygonum periscaria</i><br>(Troscot)                                  | A<br>zone perturbate,<br>terenuri arabile (16,<br>19)           | 2,1-2,3<br>(14, 19)           | L > D (13)   | 0 (19)  | < 14 (13)<br>2 (50 %) (19)                      | scarificare, stratificare rece,<br>tratament cu GA (14) strati-<br>ficare rece, maturare (17-19)<br>germinare inhibată de<br>întuneric (19) fără<br>tratamente speciale (13) | POST (13)                              | A                                      | 32                                 |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                                | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <i>Rumex crispus</i><br>(Dragavei)                                      | P<br>terenuri arabile,<br>marginea drumu-<br>rilor, zone deschise<br>(16, 19) | 1,3-1,5<br>(4, 14, 19)        | L = D (14,<br>33)  | 0<br>(4, 19, 33)                                | 3 (50 %) (19)<br>6 (100 %) (33)                 | germinare inhibată de<br>întuneric (18, 19) maturarea<br>poate fi necesară (18) fără<br>tratamente speciale (4, 14,<br>33)                             | POST (4, 33)                           | A, E                                   | 32                                 |
| <b>PRIMULACEAE</b><br><i>Anagallis arvensis</i><br>(Scânțieiuță)        | A<br>terenuri arabile,<br>zone deschise,<br>locuri perturbate<br>(16, 19)     | 0,4-0,5<br>(4, 14, 19)        | L = D (14)   |   | 1 (50 %) (19)                                   | stratificare rece, tratament cu<br>GA (1,14, 18, 19, 32)<br>germinarea necesită lumină<br>(1) fără tratamente speciale<br>(2, 4)                       | POST (2, 4)                            | A, F                                   |                                    |
| <b>RANUNCULACEAE</b><br><i>Ranunculus acris</i><br>(Piciorul-cocoșului) | P<br>terenuri arabile,<br>marginea drumu-<br>rilor, zone deschise<br>(16, 19) | 1,5-2<br>(14, 19, 29)         | L = D (14)   | 1<br>(29)                                       | 41-56 (19, 29)                                  | fără tratamente speciale<br>(5, 14, 22, 24-26)   | POST (5, 22,<br>24-26)                 |  | 32                                 |
| <b>ROSACEAE</b><br><i>Geum urbanum</i><br>(Cerențel)                    | P<br>marginea tufișurilor,<br>zone umede<br>(16, 19)                          | 0,8-1,5<br>(14, 19)           | L = D (14)   | 0 (19)  | 5 (50 %) (19)<br>16 (79 %) (18)                 | germinare inhibată de<br>întuneric (18, 19) stratificare<br>caldă (1) fără tratamente<br>speciale (5, 14, 22, 25, 26)                                  | POST (5, 22,<br>25, 26)                | A                                      |                                    |
| <b>RUBIACEAE</b><br><i>Galium aparine</i><br>(Turiță)                   | A<br>terenuri arabile,<br>zone umede, locuri<br>perturbate (16, 19)           | 7-9 (14, 19)                  | L = D (14)   |   | 5 (50 %) (19)<br>6 (100 %) (18)                 | stratificare rece (1, 18, 19)<br>germinare neafectată de<br>iradiație (18, 19) germinare<br>inhibată de lumină (1) fără<br>tratamente speciale (6, 14) | PRE și POST<br>(6, 28)                 | A                                      | 32                                 |

## ▼ M6

| FAMILIA Denumirea botanică<br>a speciei<br>(denumirea comună în română) | Durata de viață <sup>(1)</sup> și<br>habitatul                            | Greutatea<br>seminței<br>(mg) | Fotoperioada<br>pentru<br>germinare sau<br>creștere <sup>(2)</sup> | Adâncimea de<br>plantare<br>(mm) <sup>(3)</sup> | Timpul de<br>germinare<br>(zile) <sup>(4)</sup> | Tratamente speciale <sup>(5)</sup>   | Test de toxicita-<br>te <sup>(6)</sup> | Furnizori de<br>semințe <sup>(7)</sup> | Alte refe-<br>rințe <sup>(8)</sup> |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|--|--|--|------------------------------------|
| <i>Galium mollugo</i><br>(Sânziană albă)                                | P<br>maluri cu tufișuri,<br>zone deschise (8)                             | 7<br>(29)                     | L = D (14)   | 2<br>(29)                                       |   | fără tratamente speciale<br>(5, 14, 22, 24, 26, 29)  | POST (5, 22,<br>24, 26)                | A                                      |                                    |
| <b>SCROPHULARIACEAE</b><br><i>Digitalis purpurea</i><br>(Degețel roșu)  | B, P marginea<br>tufișurilor, zone<br>deschise (16, 19)                   | 0,1-0,6<br>(4, 14, 19)        | L = D (14)   | 0<br>(4, 19)                                    | 6 (50 %) (19)<br>8 (99 %) (18)                  | germinare inhibată de<br>întuneric (1, 17-19) fără<br>tratamente speciale (4, 22-<br>26)               | POST (4, 22 –<br>26)                   | D, G, F                                |                                    |
| <i>Veronica persica</i><br>(Ventrilică)                                 | A<br>terenuri arabile,<br>zone deschise,<br>locuri perturbate<br>(16, 19) | 0,5-0,6<br>(14, 19)           | L = D (14)   | 0 (19)  | 3 (19)<br>5 (96 %) (18)                         | germinare inhibată de<br>întuneric (18, 19) stratificare<br>rece (18) fără tratamente<br>speciale (14) | PRE și POST<br>(28)                    | A                                      | 32                                 |

<sup>(1)</sup> A = anuale, B = bienale, P = perene.

<sup>(2)</sup> Referințele 11, 14 și 33 se referă la proporția de lumină (L) și de întuneric (D) necesară pentru inducerea germinării semințelor. Referințele 3, 6, 9, 10, 13, 20 se referă la condițiile de cultivare în sere.

<sup>(3)</sup> 0 mm indică faptul că semințele au fost plantate la suprafața solului sau că semințele au nevoie de lumină pentru a germina.

<sup>(4)</sup> Numerele furnizate reprezintă numărul de zile în care un procentaj de semințe au germinat conform referinței furnizate, de exemplu germinare de 3 zile (50 %) (referința 19).

<sup>(5)</sup> Durata maturării și/sau a stratificării nu este întotdeauna disponibilă. Cu excepția cerințelor de tratament la rece, condițiile de temperatură nu sunt specificate, deoarece în testarea în sere controlul asupra temperaturii este limitat. Majoritatea semințelor vor germina în condiții de fluctuație a temperaturilor din sere.

<sup>(6)</sup> Indică faptul că specia a fost utilizată într-un test de toxicitate pe plante preapariție (PRE) și/sau postapariție (POST) implicând erbicide.

<sup>(7)</sup> Furnizează exemple de furnizori comerciali de semințe.

<sup>(8)</sup> Furnizează două referințe alternative care au fost consultate.

▼ **M6****Furnizori de semințe citați**

| Identificarea furnizorului | Informații despre furnizor  |
|----------------------------|---|
| A                          | Herbiseed<br>New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ANGLIA<br>+44 (0) 1189 349 464<br><br>www.herbiseed.com  |
| B                          | Tropilab Inc.<br>8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 SUA<br>(727) 344 – 4050<br>www.tropilab.com                 |
| C                          | Pterophylla – Native Plants & Seeds<br>#316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0<br>CANADA (519) 586 – 3985 |
| D                          | Applewood Seed Co.<br>5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 SUA (303) 431 – 7333<br>www.applewoodseed.com                 |
| E                          | Ernst Conservation Seeds<br>9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 SUA<br>(800) 873 – 3321<br>www.ernstseed.com        |
| F                          | Chiltern Seeds<br>Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ANGLIA<br>+44 1229 581137<br>www.chilternseeds.co.uk     |
| G                          | Thompson & Morgan<br>P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 – 7333<br><br>www.thompson-morgan.com      |

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: *Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼ **M6**

- (7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. ([www.ernstseed.com](http://www.ernstseed.com))
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew ([www.rbgekew.org.uk/data/sid](http://www.rbgekew.org.uk/data/sid))
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

▼ **M6**

- (26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
- (27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC – Weeds*. pp. 1021-1028.
- (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
- (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbi-seed.com>)
- (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
- (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
- (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
- (33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.
- (34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.



**▼ M6***Apendicele 4***Exemple de condiții de creștere pentru anumite specii cultivate**

Următoarele condiții s-au dovedit a fi adecvate pentru 10 specii cultivate și pot fi utilizate ca orientare pentru teste în camere de cultivare și în cazul altor specii:

concentrația de dioxid de carbon:  $350 \pm 50$  ppm;

umiditatea relativă:  $70 \pm 5$  % pe perioadele de lumină și  $90 \pm 5$  % pe perioadele de întuneric;

temperatura:  $25 \pm 3$  °C în timpul zilei,  $20 \pm 3$  °C în timpul nopții;

fotoperioada: 16 ore de lumină/8 ore de întuneric, presupunând o lungime de undă medie de 400-700 nm;

lumina: luminanță de  $350 \pm 50$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , măsurată deasupra frunzișului.

Speciile cultivate sunt:

- pătlăgeaua roșie (*Solanum lycopersicon*);
- castravetele (*Cucumis sativus*);
- salata verde (*Lactuca sativa*);
- soia (*Glycine max*);
- varza (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
- morcovul (*Daucus carota*);
- ovăzul (*Avena sativa*);
- zizania (*Lolium perenne*);
- porumbul (*Zea mays*);
- ceapa (*Allium cepa*).

▼ **M6****C.32. TEST DE REPRODUCERE A ENCHITREIDELOR****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 220 (2004). Aceasta este destinată utilizării în scopul evaluării efectelor substanțelor chimice asupra ratei de reproducere a viermelui enchitreid, *Enchytraeus albidus*, Henle 1873, în sol. Are ca bază principală o metodă elaborată de Umweltbundesamt, Germania (1) care a fost supusă unui ring test (2). Au fost luate în considerare și alte metode de testare a toxicității substanțelor chimice asupra enchitreidelor și rămelor (3)(4)(5)(6)(7)(8).

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

2. Anelidele din genul *Enchytraeus* care trăiesc în sol sunt specii relevante din punct de vedere ecologic pentru testarea ecotoxicității. Deși enchitreidele se găsesc adesea în soluri care conțin răme, este adevărat și faptul că de multe ori acestea sunt prezente în abundență în multe soluri din care rămele lipsesc. Enchitreidele pot fi utilizate în testele de laborator, precum și în studiile derulate pe teren sau parțial pe teren. Din punct de vedere practic, multe specii de *Enchytraeus* sunt ușor de manipulat și de înmulțit, iar durata generației lor este semnificativ mai scurtă decât în cazul rămelor. Durata unui test de reproducere cu enchitreide este, prin urmare, de doar 4-6 săptămâni, în timp ce în cazul rămelor (*Eisenia fetida*) acesta durează 8 săptămâni.
3. Informații de bază despre ecologia și ecotoxicologia enchitreidelor în mediul terestru pot fi găsite în referințele (9)(10)(11)(12).

**PRINCIPIUL TESTULUI**

4. Enchitreidele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare amestecate într-un sol artificial. Scenariul de testare poate fi împărțit în două etape: (a) un test de stabilire a intervalului, în cazul în care nu sunt disponibile suficiente informații, în care mortalitatea reprezintă principalul punct final evaluat după două săptămâni de expunere și (b) un test de reproducere final în care se evaluează numărul total de viermi tineri produs de animalul părinte și rata de supraviețuire a animalelor părinți. Durata testului final este de șase săptămâni. După primele trei săptămâni, viermii adulți se scot și se înregistrează schimbările morfologice. După încă trei săptămâni, se calculează numărul de descendenți eclozați din coconii produși de adulți. Rata de reproducere a animalelor expuse la substanța chimică de testare este comparată cu cea din proba (probele) de control în vederea determinării (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau (ii)  $EC_x$  (de exemplu  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) utilizând un model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza o reducere cu x % a ratei de reproducere. Concentrațiile de testare trebuie să încadreze  $EC_x$  (de exemplu  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) astfel încât  $EC_x$  să fie mai degrabă interpolată decât extrapolată.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE**

5. Ar fi de preferat să se cunoască solubilitatea în apă,  $\log K_{ow}$ , coeficientul de partiție sol/apă (de exemplu capitolele C.18 și C.19 din prezenta anexă) și presiunea de vapori a substanței chimice de testare. Sunt de dorit informații suplimentare privind evoluția substanței chimice de testare în sol, precum viteza de fotoliză și de hidroliză.
6. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței chimice de testare va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție aer/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

**▼ M6****VALIDITATEA TESTULUI**

7. Pentru ca testul să fie valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:
  - mortalitatea adulților nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului de stabilire a intervalului și în primele trei săptămâni ale testului de reproducere;
  - presupunând că s-au folosit 10 adulți pentru fiecare vas pentru pregătirea testului, la finalul testului trebuie să fi fost produsă o medie de cel puțin 25 de viermi tineri în fiecare vas;
  - coeficientul de variație calculat pentru numărul mediu de viermi tineri nu trebuie să fie mai mare de 50 % la finalul testului de reproducere.

În cazul în care un test nu îndeplinește criteriile de validitate de mai sus, testul trebuie încheiat, cu excepția cazului în care poate fi oferită o justificare pentru continuarea testului. Justificarea trebuie inclusă în raportul de testare.

**SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

8. Pentru a verifica dacă răspunsul organismelor de testare nu s-a modificat în timp, o substanță chimică de referință trebuie să fie testată la intervale regulate sau, eventual, să fie inclusă în fiecare test. O substanță chimică de referință adecvată este carbendazimul, care s-a demonstrat că afectează supraviețuirea și reproducerea enchitreidelor (13)(14), sau pot fi utilizate alte substanțe chimice ale căror date despre toxicitate sunt bine cunoscute. În cadrul unui ring test (2), s-a utilizat o formulă de carbendazim cunoscută sub denumirea comercială Derosal <sup>TM</sup> furnizată de societatea AgrEvo (Frankfurt, Germania) și conținând 360 g/l (32,18 %) ingredient activ. EC<sub>50</sub> pentru reproducere determinată în cadrul ring testului s-a încadrat în limita a 1,2 ± 0,8 mg ingredient activ (i.a.)/kg masă uscată (2). În cazul în care este inclus în seria de testare un standard toxic pozitiv, se utilizează o concentrație, iar numărul de probe duplicat trebuie să fie același cu cel de probe de control. Pentru carbendazim, se recomandă testarea a 1,2 mg i.a./kg greutate uscată (testat ca formulă lichidă).

**DESCRIEREA TESTULUI****Echipamente**

9. Vasele de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. Borcanele de sticlă (de exemplu, volum: 0,20-0,25 litri; diametru: ≈ 6 cm) sunt adecvate. Vasele trebuie să aibă capace transparente (de exemplu din sticlă sau din polietilenă) care să fie concepute pentru a reduce evaporarea apei, permițând în același timp schimbul de gaze între sol și atmosferă. Capacele trebuie să fie transparente pentru a permite trecerea luminii.
10. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă în special următoarele:
  - dulap pentru uscare;
  - stereomicroscop;
  - pH-metru și fotometru;
  - cântare de precizie adecvate;
  - echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;
  - echipamente adecvate pentru controlul umidității (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt prevăzute cu capace);
  - incubator sau o cameră mică prevăzută cu sistem de climatizare;
  - pensete, cârlige sau anse;
  - bazin fotografic.

**Pregătirea solului artificial**

11. În cadrul prezentului test se utilizează un sol artificial (5)(7) având următoarea compoziție (pe baza greutatea uscată, uscat la o temperatură de 105 °C până la obținerea unei greutăți constante):

▼ **M6**

- 10 % turbă cu mușchi, uscată cu aer și măcinată fin (este acceptabilă o dimensiune de  $2 \pm 1$  mm a particulelor); se recomandă să se verifice dacă un sol preparat cu un lot proaspăt de turbă este adecvat pentru cultura viermilor înainte de a fi utilizat pentru un test;
- 20 % argilă caolinică (de preferință, conținut caolinit de peste 30 %);
- aproximativ 0,3-1,0 % carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, puritate analitică) pentru a obține un pH de  $6,0 \pm 0,5$ ; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei;
- aproximativ 70 % nisip cuarțos uscat cu aer (în funcție de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % dintre particule măsurând între 50 și 200 de microni.

Se recomandă demonstrarea caracterului adecvat al unui sol artificial pentru cultura viermilor și pentru îndeplinirea criteriilor de validitate înainte de a-l utiliza în cadrul unui test final. Efectuarea unei astfel de verificări se recomandă în special pentru a asigura faptul că performanța testului nu este compromisă în cazul în care conținutul de carbon organic al solului artificial este redus, de exemplu, prin reducerea conținutului de turbă la 4-5 % și creșterea conținutului de nisip în consecință. Printr-o astfel de reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de adsorbție a substanței chimice de testare în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice de testare pentru viermi. S-a demonstrat că *Enchytraeus albidus* poate satisface criteriile de validitate privind reproducerea când este testat pe soluri naturale cu conținut mai scăzut de carbon organic decât cel menționat mai sus (de exemplu 2,7 %) (15) și s-a constatat experimental, deși într-un număr limitat de studii, că acest rezultat poate fi obținut și cu un sol artificial cu 5 % turbă.

*Notă:* Când se utilizează sol natural în cadrul unui test suplimentar (de exemplu, la un nivel superior), trebuie să se demonstreze, de asemenea, caracterul adecvat al solului și îndeplinirea criteriilor de validitate ale testului.

12. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un mixer de laborator mare). Această operațiune trebuie realizată cu cel puțin o săptămână înainte de începerea testului. Solul amestecat trebuie depozitat timp de două zile pentru a i se echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și 1 M de soluție de clorură de potasiu (KCl) sau 0,01 M de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) într-un raport de 1:5 [a se vedea referința (16) și apendicele 3]. Dacă aciditatea solului este mai mare decât limita impusă (a se vedea punctul 11), aceasta poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de  $\text{CaCO}_3$ . Dacă solul este prea alcalin, acest lucru poate fi ajustat prin adăugarea unei cantități suplimentare din amestecul menționat la punctul 11, dar fără  $\text{CaCO}_3$ .
13. Capacitatea maximă de retenție a apei (WHC) a solului artificial se determină conform procedurilor descrise în apendicele 2. Cu una-două zile înainte de începerea testului, solul artificial uscat este preumezit prin adăugarea unei cantități suficiente de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, adică 40-60 % din capacitatea maximă de retenție a apei. La începutul testului, solul preumezit este împărțit în porții corespunzătoare numărului de concentrații de testare (și substanța chimică de referință, dacă este cazul) și de probe de control folosite pentru test. Conținutul de umiditate se ajustează la 40-60 % din

▼ **M6**

WHC maximă prin adăugarea soluției de substanță chimică de testare și/sau prin adăugarea de apă distilată sau deionizată (a se vedea punctele 19-21). Conținutul de umiditate se determină la începutul și la sfârșitul testului (prin uscarea la 105 °C până la obținerea unei greutate constante) și ar trebui să se încadreze în intervalul optim pentru supraviețuirea viermilor. Se poate efectua o verificare aproximativă a conținutului de umiditate din sol strângând ușor solul în mână; în cazul în care conținutul de umiditate este cel corect, trebuie să apară între degete picături mici de apă.

#### **Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare**

14. Specia de testare recomandată este *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (viermele alb), membru al familiei *Enchytraeidae* (ordinul *Oligochaeta*, încrengătura *Annelida*). *E. albidus* este una dintre cele mai mari specii de enchitreide, fiind înregistrate specimene de până la 35 mm lungime (17)(18). *E. albidus* are o răspândire mondială și poate fi întâlnit în habitate marine, de apă dulce și terestre, în special în materia organică aflată în descompunere (alge, compost) și rareori în pajiști (9). Toleranța sa ecologică largă și unele variații morfologice ar putea indica existența diferitelor rase.
  
15. *E. albidus* este disponibil în comerț ca hrană pentru pești. Ar trebui verificat dacă cultura este contaminată cu alte specii, în general mai mici (1) (19). În cazul în care apare contaminarea, toți viermii ar trebui spălați cu apă într-o cutie Petri. Apoi ar trebui selectate specimene adulte mari de *E. albidus* (utilizând un stereomicroscop) pentru a începe o nouă cultură, iar toți ceilalți viermi se elimină. *E. albidus* poate fi crescut cu ușurință pe o gamă largă de materii organice (a se vedea appendicele 4). Ciclul de viață al *E. albidus* este scurt deoarece maturitatea survine între 33 de zile (la 18 °C) și 74 de zile (la 12 °C) (1). Pentru test se vor utiliza numai culturile care au fost păstrate fără probleme în laborator timp de cel puțin 5 săptămâni (o generație).
  
16. Pot fi utilizate și alte specii din genul *Enchytraeus*, de exemplu *E. buchholzi* Vejdovsky 1879, sau *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (a se vedea appendicele 5). Dacă se folosesc alte specii de *Enchytraeus*, acestea trebuie să fie clar identificate și ar trebui raportată o justificare pentru selectarea speciei.
  
17. Animalele care se utilizează în cadrul testelor sunt viermii adulți. Aceștia trebuie să aibă ouă (puncte albe) în zona clitelului și ar trebui să aibă aproximativ aceeași dimensiune (în jur de 1 cm lungime). Sincronizarea culturii de înmulțire nu este necesară.
  
18. Dacă enchitreidele nu sunt crescute în același tip de sol și în aceleași condiții (inclusiv de hrănire) utilizate pentru test, acestea trebuie aclimatizate timp de cel puțin 24 de ore și până la trei zile. Pentru a permite respingerea speciilor rănite sau inadecvate pentru orice alt motiv, trebuie aclimatizat la început un număr mai mare de adulți decât cel necesar pentru desfășurarea testului. La finalul perioadei de aclimatizare, se vor selecta pentru test numai viermii care au ouă și care nu prezintă anomalii de comportament (de exemplu să încerce să iasă din sol). Viermii se scot cu atenție utilizând o pensetă de bijutier, cârlige sau anse și se pun într-o cutie Petri conținând o cantitate mică de apă proaspătă. Pentru acest scop se preferă apa proaspătă reconstituită, conform propunerii din capitolul C.20 al prezentei anexe (Test de reproducere pentru *Daphnia magna*), deoarece apa deionizată, demineralizată sau de la robinet ar putea fi dăunătoare viermilor. Viermii se inspectează cu ajutorul unui stereomicroscop și toți cei care nu au ouă se elimină. Trebuie avut grijă să se scoată și să se elimine acarienii sau colebolele care ar fi putut infecta culturile. Viermii sănătoși neutilizați pentru test se pun înapoi în cultura stoc.

▼ **M6****Pregătirea concentrațiilor de testare***Substanță chimică de testare solubilă în apă*

19. În apă deionizată, se pregătește o soluție a substanței chimice de testare, într-o cantitate suficientă pentru toate probele duplicat necesare pentru o concentrație de testare. Se recomandă utilizarea unei cantități corespunzătoare de apă pentru a obține conținutul de umiditate necesar, și anume 40-60 % din WHC maximă (a se vedea punctul 13). Fiecare soluție de substanță chimică de testare se amestecă bine cu un lot de sol preumezit în prealabil înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

*Substanță chimică de testare insolubilă în apă*

20. În cazul substanțelor chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică de testare poate fi dizolvată în cel mai mic volum posibil al unui dizolvant adecvat (de exemplu, acetonă). Trebuie utilizați numai solvenți volatili. Dizolvantul se pulverizează sau se amestecă cu o cantitate redusă, de exemplu 2,5 g, de nisip cuarțos. Dizolvantul se elimină prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin o oră. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după adăugarea unei cantități corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține umiditatea dorită. Amestecul final se introduce în vasele de testare.
21. În cazul substanțelor chimice puțin solubile în apă și solvenți organici, echivalentul de 2,5 g de nisip cuarțos fin măcinat pentru fiecare vas de testare este amestecat cu cantitatea de substanță chimică pentru a obține concentrația de testare dorită. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final se distribuie în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, o probă de control corespunzătoare.
22. În general, substanțele chimice nu ar trebui testate la concentrații mai mari de 1 000 mg/kg masă uscată de sol. Testarea la concentrații mai mari poate fi totuși necesară pentru obiectivele unui anumit test.

**DEFĂȘURAREA TESTELOR****Grupuri de testare și de control**

23. Pentru fiecare concentrație de testare, o cantitate de sol de testare corespunzătoare unei cantități de 20 g de greutate uscată se pune în vasul de testare (a se vedea punctele 19-21). Se pregătesc, de asemenea, probe de control, fără substanța chimică de testat. În fiecare vas se adaugă hrană în conformitate cu procedurile descrise la punctul 29. În fiecare vas de testare se distribuie aleatoriu 10 viermi. Viermii se transferă cu atenție în fiecare vas de testare și se așează pe suprafața solului utilizând, de exemplu, o pensetă de bijutier, cârlige sau anse. Numărul de probe duplicat pentru concentrațiile de testare și pentru probele de control depinde de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctul 34). Vasele de testare sunt poziționate în mod aleatoriu în incubatorul de testare, respectivele poziții fiind modificate săptămânal.
24. În cazul utilizării unui dizolvant pentru aplicarea substanței chimice de testare, pe lângă seriile de testare, trebuie testată o serie de control conținând nisip cuarțos pulverizat sau amestecat cu solvent. Concentrația solventului sau a agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele de testare ce conțin substanța chimică de testare. Pentru substanțele chimice care necesită o administrare conformă cu procedurile descrise la punctul 21, trebuie testată o serie de control care să conțină nisip cuarțos suplimentar (2,5 g per vas).

**▼ M6****Condițiile de testare**

25. Temperatura medie de testare este de  $20 \pm 2$  °C. Pentru a împiedica viermii să iasă din sol, testul se efectuează în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în zona vaselor de testare.
26. Pentru a verifica umiditatea solului, vasele se cântăresc la începutul testului, iar apoi o dată pe săptămână. Pierderea în greutate se compensează prin adăugarea unei cantități adecvate de apă deionizată. Trebuie remarcat faptul că pierderea de apă poate fi redusă prin menținerea unei umidități ridicate a aerului (> 80 %) în incubatorul de testare.
27. Conținutul de umiditate și pH-ul trebuie măsurate la începutul și la sfârșitul testului atât în cazul testului de stabilire a intervalului, cât și în cazul testului final. Trebuie efectuate măsurători în eșantioanele de sol de control și tratate (la toate concentrațiile), preparate și menținute în aceleași condiții ca și culturile de testare, dar fără să conțină viermi. La aceste eșantioane se adaugă hrană numai la începutul testului pentru a facilita activitatea microbiană. Cantitatea de hrană adăugată trebuie să fie identică cu cea adăugată în culturile de testare. Nu este necesar să se mai adauge hrană în aceste vase pe parcursul testului.

**Hrănirea**

28. Poate fi utilizată o hrană care poate întreține populația de enchitreide. S-a constatat că fulgii de ovăz, de preferat autoclavați înainte de utilizare pentru a evita contaminarea microbiană (încălzirea este, de asemenea, adecvată), reprezintă o hrană corespunzătoare.
29. La început, hrana se administrează amestecând 50 mg de fulgi de ovăz măcinați cu solul din fiecare vas înainte de a introduce viermii. Apoi, hrana se administrează zilnic până în ziua 21. În ziua 28 nu se mai administrează hrană, deoarece în această etapă adulții vor fi fost scoși iar viermii tineri au nevoie de hrană suplimentară relativ puțină după acest moment. Hrana din timpul testului constă în 25 mg de fulgi de ovăz măcinați pentru fiecare vas, așezați cu atenție pe suprafața solului pentru a evita rănirea viermilor. Pentru a evita creșterea ciupercilor, fulgii de ovăz trebuie îngropați în sol prin acoperirea lor cu mici cantități de sol. Dacă hrana rămâne neconsumată, rația trebuie redusă.

**Proiectul testului de stabilire a intervalului**

30. Atunci când este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații ale substanțelor chimice de testare de 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg (greutate uscată a solului). O probă duplicat pentru fiecare tratament și fiecare probă de control este suficientă.
31. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni. La sfârșitul testului, se evaluează mortalitatea viermilor. Un vierme este înregistrat ca fiind mort dacă nu are nicio reacție la un stimul mecanic la capătul anterior. Pentru a decide intervalul de concentrații pentru testul final, pot fi utile și alte informații pe lângă mortalitate. Modificările comportamentului adulților (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol, poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei lor (de exemplu, prezența unor răni deschise) ar trebui, prin urmare, să fie consemnate împreună cu eventuala prezență a viermilor tineri. Aceasta din urmă poate fi determinată prin utilizarea metodei colorării descrise în appendicele 6.
32.  $LC_{50}$  se poate determina cu aproximație prin calcularea mediei geometrice a datelor legate de mortalitate. La stabilirea intervalului de concentrații pentru testul final, efectele asupra reproducerii se presupun a fi mai mici decât  $LC_{50}$  cu un factor de maximum 10. Cu toate acestea, este vorba despre o

**▼ M6**

relație empirică și, în orice caz specific, aceasta ar putea fi diferită. Observațiile suplimentare din timpul testului de stabilire a intervalului precum prezența viermilor tineri poate ajuta la rafinarea intervalului de concentrații ale substanței chimice de testare care vor fi utilizate pentru testul final.

33. Pentru o determinare precisă a  $LC_{50}$ , se recomandă efectuarea testului utilizând cel puțin patru probe duplicat pentru fiecare dintre concentrațiile substanței chimice de testare și un număr adecvat de concentrații pentru a cauza cel puțin patru răspunsuri medii semnificativ diferite din punct de vedere statistic la aceste concentrații. Dacă este cazul, se utilizează un număr similar de concentrații și de probe duplicat pentru probele de control.

**Proiectul testului de reproducere final**

34. Sunt propuse trei proiecte de test, pe baza recomandărilor formulate în cadrul unui ring test (2).

— Pentru stabilirea NOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie distanțate cu un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

— Pentru determinarea  $EC_x$  (de exemplu  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ), trebuie testate cel puțin cinci concentrații, iar concentrațiile trebuie să încadreze  $EC_x$  pentru a permite interpolarea și nu extrapolarea  $EC_x$ . Se recomandă cel puțin patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și patru probe duplicat de control. Factorul de diluție poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în seria de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrațiile cele mai mari și cele mai scăzute.

— O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și  $EC_x$ . Trebuie utilizate opt concentrații de tratament în serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare tratament și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie distanțate cu un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

35. Trebuie utilizați câte 10 viermi adulți pentru fiecare vas de testare (a se vedea punctul 23). Hrana se adaugă în vasele de testare la începutul testului, iar apoi o dată pe săptămână (a se vedea punctul 29) până inclusiv în ziua 21. În ziua 21, probele de sol se verifică ușor cu mâna pentru a observa și a număra viermii adulți vii, iar modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol, poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) se consemnează. Ulterior, toți viermii adulți se scot din vasele de testare și din solul de testare. Solul de testare conținând eventual coconii produși se incubează timp de trei săptămâni suplimentare în aceleași condiții de testare, cu excepția faptului că hrănirea are loc abia în ziua 35 (adică, 25 mg de fulgi de ovăz măcinați pentru fiecare vas).

36. După șase săptămâni, se numără viermii nou eclozați. Se recomandă metoda bazată pe colorarea cu roșu Bengal (a se vedea appendicele 6), deși s-au dovedit a fi adecvate și alte tehnici de extracție umedă (dar fără căldură) și de flotatie (a se vedea appendicele 6) (4)(10)(11)(20). Se recomandă colorarea cu roșu Bengal deoarece extracția umedă dintr-un substrat de sol poate fi împiedicată de turbiditatea cauzată de particulele de argilă în suspensie.

**Test la valori-limită**

37. În cazul în care nu se observă niciun efect la cea mai mare concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere poate fi realizat sub forma unui test la valori-limită, utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg pentru a demonstra că NOEC pentru reproducere este mai mare decât această valoare.



▼ **M6****Rezumatul și calendarul testului**

38. Etapele testului pot fi rezumate după cum urmează:

| Momentul                | Testul de stabilire a intervalului  | Testul final  |
|-------------------------|---|---|
| Ziua -7 sau mai devreme | — Pregătirea solului artificial (amestecarea constituenților uscați)  | — Pregătirea solului artificial (amestecarea constituenților uscați)  |
| Ziua -5                 | — Verificarea pH-ului solului artificial<br>— Măsurarea WHC max. a solului  | — Verificarea pH-ului solului artificial<br>— Măsurarea WHC max. a solului  |
| Ziua -5 până la -3      | — Sortarea viermilor pentru aclimatizare  | — Sortarea viermilor pentru aclimatizare  |
| Ziua -3 până la 0       | — Aclimatizarea viermilor timp de cel puțin 24 de ore   | — Aclimatizarea viermilor timp de cel puțin 24 de ore   |
| Ziua -1                 | — Preumezirea solului artificial și distribuirea în loturi  | — Preumezirea solului artificial și distribuirea în loturi  |
| Ziua 0                  | — Prepararea soluțiilor stoc<br>— Aplicarea substanței chimice de testare<br>— Cântărirea substratului de testare în vasele de testare<br>— Amestecarea hranei în sol<br>— Introducerea viermilor<br>— Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol | — Prepararea soluțiilor stoc<br>— Aplicarea substanței chimice de testare<br>— Cântărirea substratului de testare în vasele de testare<br>— Amestecarea hranei în sol<br>— Introducerea viermilor<br>— Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol |
| Ziua 7                  | — Verificarea conținutului de umiditate din sol   | — Verificarea conținutului de umiditate din sol<br>— Hrană  |
| Ziua 14                 | — Determinarea mortalității adulților<br>— Estimarea numărului de viermi tineri<br>— Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol   | — Verificarea conținutului de umiditate din sol<br>— Hrană  |
| Ziua 21                 |   | — Observarea comportamentului adulților<br>— Scoaterea adulților<br>— Determinarea mortalității adulților<br>— Verificarea conținutului de umiditate din sol<br>— Hrană   |
| Ziua 28                 |   | — Verificarea conținutului de umiditate din sol<br>— Fără hrană   |
| Ziua 35                 |   | — Verificarea conținutului de umiditate din sol<br>— Hrană  |
| Ziua 42                 |   | — Numărarea viermilor tineri<br>— Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol  |

**▼ M6****DATE ȘI RAPORT****Prelucrarea rezultatelor**

39. Cu toate că în apendicele 7 este furnizată o prezentare generală, în cadrul prezentei metode de testare nu este oferită nicio orientare statistică definitivă pentru analiza rezultatelor testului.
40. În cadrul testului de stabilire a intervalului, punctul final principal este mortalitatea. Cu toate acestea, modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) viermilor adulți trebuie, de asemenea, înregistrate împreună cu prezența eventualelor viermi tineri. De obicei, trebuie aplicată analiza probit (21) sau regresia logistică pentru determinarea  $LC_{50}$ . Cu toate acestea, în cazurile în care această metodă de analiză nu este adecvată (de exemplu, dacă sunt disponibile mai puțin de trei concentrații având ca efect mortalitatea parțială), pot fi utilizate metode alternative. Aceste metode ar putea include mediile mobile (22), metoda simplificată Spearman-Kärber (23) sau simpla interpolare (de exemplu, media geometrică a  $LC_0$  și  $LC_{100}$ , calculată prin înmulțirea rădăcinii pătrate a  $LC_0$  cu  $LC_{100}$ ).
41. În cadrul testului final, punctul final principal este fecunditatea (adică numărul de viermi tineri produși). Cu toate acestea, ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne de nocivitate trebuie înregistrate în raportul final. Pentru a calcula rezultatele reproducerii, analiza statistică necesită cunoașterea mediei aritmetice și a abaterii standard per tratament și per probă de control.
42. Dacă s-a efectuat o analiză a varianței, abaterea standard,  $s$ , și gradele de libertate,  $df$ , pot fi înlocuite de estimarea varianței combinate obținute din ANOVA și, respectiv, de gradele sale de libertate, cu condiția ca varianța să nu depindă de concentrație. În acest caz, se utilizează varianțele unice ale probelor de control și ale probelor supuse tratamentului. Respectivul valori se calculează de obicei cu ajutorul unui software statistic comercial utilizând ca duplicat rezultatele pentru fiecare vas. În cazul în care combinarea datelor pentru probele de control negative și pentru probele de control cu solvent pare rezonabilă în locul testării în raport cu una dintre ele, acestea trebuie testate pentru a vedea dacă nu diferă în mod semnificativ (pentru teste adecvate, a se vedea punctul 45 și apendicele 7).
43. Testarea statistică și inferența suplimentare depind de distribuția normală și omogenitatea valorilor duplicate în ceea ce privește varianța.

**Estimarea NOEC**

44. Ar fi de preferat aplicarea unor teste puternice. Trebuie utilizate informații, de exemplu, din experiența anterioară din cadrul ring testelor sau alte date istorice, cu privire la distribuția aproximativ normală a datelor. Omogenitatea varianței (omoscedasticitatea) este mai importantă. Experiența arată că varianța crește adesea odată cu creșterea mediei. În aceste cazuri, o transformare a datelor ar putea duce la homoscedasticitate. Cu toate acestea, o astfel de transformare ar trebui să se bazeze mai degrabă pe experiența cu datele istorice decât pe datele studiate. Cu date omogene, ar trebui efectuate teste  $t$  multiple cum ar fi testul lui Williams ( $\alpha = 0,05$ , unilateral) (24)(25) sau, în anumite cazuri, testul lui Dunnett (26)(27). Trebuie remarcat faptul că, în cazul unei duplicări inegale, valorile  $t$  din tabel trebuie corectate astfel cum au sugerat Dunnett și Williams. Uneori, din cauza variației mari, răspunsurile nu cresc/descresc în mod regulat. În acest caz de abatere puternică de la monotonicitate, testul lui Dunnett este mai adecvat. Dacă există abateri de la homoscedasticitate, ar putea fi rezonabilă examinarea mai îndeaproape a posibilelor efecte asupra varianțelor pentru a decide dacă testele  $t$  pot fi aplicate fără a pierde mult din putere (28). În mod alternativ, se poate aplica un test  $U$  multiplu, de exemplu testul

▼ **M6**

U al lui Bonferroni după Holm (29), sau, când aceste date prezintă heteroscedasticitate, dar din alte puncte de vedere corespund unei relații doză-răspuns subiacente monotone, un alt test neparametric [de exemplu, Jonckheere-Terpstra (30) (31) sau Shirley (32) (33)] și ar fi în general de preferat testelor t cu varianță inegală. (A se vedea, de asemenea, schema din appendicele 7.)

45. Dacă s-a efectuat un test la valori-limită, iar premisele procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate) sunt îndeplinite, poate fi utilizat testul t (Student) pe perechi sau procedura de testare U al lui Mann-Whitney (29).

**Estimarea  $EC_x$** 

46. Pentru a calcula orice valoare a  $EC_x$ , se utilizează mediile pentru fiecare tratament pentru analiza regresiei (liniară sau neliniară), după obținerea unei funcții doză-răspuns adecvate. Pentru creșterea viermilor considerată răspuns continuu, valorile  $EC_x$  pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată (35). Printre funcțiile potrivite pentru datele binare (mortalitate/supraviețuire și număr de descendenți produși) se numără funcția sigmoidă normală, funcția logistică sau funcția Weibull, cu doi sau patru parametri, dintre care unii pot modela și răspunsuri hormetice. Dacă s-a stabilit o funcție doză-răspuns prin analiză de regresie liniară, trebuie obținut un  $r^2$  (coeficient de determinare) și/sau o pantă semnificative în analiza de regresie înainte de a estima  $EC_x$  prin introducerea unei valori corespunzătoare x % din media probelor de control în ecuația obținută prin analiza de regresie. Limitele de încredere de 95 % se calculează după metoda lui Fieller [citată de Finney (21)] sau după alte metode moderne adecvate.

47. Alternativ, răspunsul se modelează ca procentaj sau proporție din parametrul modelului, care se interpretează ca răspuns mediu al probelor de control. În aceste cazuri, curba sigmoidă normală (logistică, Weibull) poate fi adesea ajustată la rezultate utilizând procedura de regresie probit (21). În aceste cazuri, funcția de ponderare trebuie ajustată pentru răspunsurile metrice potrivit lui Christensen (36). Cu toate acestea, dacă se observă o hormeză, analiza probit ar trebui înlocuită cu o funcție logistică sau Weibull cu patru parametri, stabilită printr-o procedură de regresie neliniară (36). Dacă este imposibilă ajustarea unei funcții doză-răspuns adecvate la date, se pot utiliza metode alternative de estimare a  $EC_x$  și a limitelor sale de încredere, cum ar fi mediile mobile după Thompson (22) și procedura Spearman-Kärber simplificată (23).

**RAPORTUL DE TESTARE**

48. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică de testare:*

- natura fizică și, după caz, proprietățile fizico-chimice (de exemplu solubilitatea în apă, presiunea de vapori);
- identificarea chimică a substanței chimice de testare în conformitate cu nomenclatorul IUPAC, numărul CAS, lotul de fabricație, lotul de ambalare, formula structurală și puritatea;
- data de expirare a eșantionului.

*Specia de testare:*

- animalele de testare utilizate: specia, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de înmulțire.

*Condițiile de testare:*

- ingredientele și pregătirea solului artificial;

▼ **M6**

- metoda de aplicare a substanței chimice de testare;
- descrierea condițiilor de testare, inclusiv temperatura, conținutul de umiditate, pH-ul etc.;
- descrierea completă a protocolului și a procedurilor de testare.

*Rezultatele testului:*

- mortalitatea viermilor adulți după două săptămâni și numărul de viermi tineri la finalul testului de stabilire a intervalului;
- mortalitatea viermilor adulți după trei săptămâni de expunere și numărul total de viermi tineri la finalul testului final;
- orice simptom fizic sau patologic și orice modificare a comportamentului observate la organismele de testare;
- valorile  $LC_{50}$ , NOEC și/sau  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$ ) pentru reproducere, în cazul în care unele dintre acestea sunt aplicabile cu intervale de încredere și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea acestora, toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

Abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. și Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. și Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. și Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) Capitolul C.8 al prezentei anexe, Toxicitatea la râme.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.
- (7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (8) Rundgren, S. și A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* **23**, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. **7**, 246-249.
- (11) Dunger, W. și Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼ **M6**

- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. și Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. și Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. și Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. *Ann. Limnol.* 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. și Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3<sup>rd</sup> ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo și R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (24) 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.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.

**▼M6**

- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. și F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2<sup>nd</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. și J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

**▼ M6***Apendicele 1***Definiții**

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

**„Substanță chimică”** înseamnă o substanță sau un amestec.

**„EC<sub>x</sub>”** (concentrația efectivă pentru un efect de x %) înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. În cadrul prezentului test, concentrațiile efective sunt exprimate ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

**„LC<sub>0</sub>”** (concentrație neletală) înseamnă concentrația unei substanțe chimice de testare care nu ucide niciunul dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC<sub>0</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

**„LC<sub>50</sub>”** (concentrație letală medie) înseamnă concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 50 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC<sub>50</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

**„LC<sub>100</sub>”** (concentrație în întregime letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 100 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC<sub>100</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

**„LOEC”** (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) înseamnă cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat care are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ). În cadrul prezentului test, LOEC este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare. Toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să indice în mod normal un efect diferit din punct de vedere statistic de cel observat în cazul probei de control. Orice abatere de la cele sus-menționate pentru identificarea LOEC trebuie justificată în raportul de testare.

**„NOEC”** (concentrația la care nu se observă niciun efect) înseamnă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare aflată imediat sub LOEC la care nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

**„Rată de reproducere”** înseamnă numărul mediu de viermi tineri produși raportat la numărul de adulți pe parcursul perioadei de testare.

**„Substanță chimică de testare”** înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

▼ **M6***Apendicele 2***Determinarea capacității maxime de retenție a apei****Determinarea capacității de retenție a apei a solului artificial**

Următoarea metodă s-a dovedit a fi adecvată. Ea este descrisă în anexa C la ISO DIS 11268-2.

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru și, după umplerea sa cu apă, se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas închis (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită, uscată la o temperatură de 105 °C până ce atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC}(\text{în \% din masa uscată}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat cu apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

**BIBLIOGRAFIE:**

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.



**▼ M6***Apendicele 3***Determinarea pH-ului solului**

Următoarea metodă de determinare a pH-ului probei de sol se bazează pe descrierea din ISO 10390 (Calitatea solului – Determinarea pH-ului).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său formată din 1 M de clorură de potasiu (KCl) de puritate analitică sau 0,01 M de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) de puritate analitică. Ulterior, suspensia se agită bine timp de cinci minute. După agitare, suspensia se lasă la limpezit timp de cel puțin 2 ore, dar nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).

**BIBLIOGRAFIE:**

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

## ▼ M6

## Apendicele 4

Condiții de cultură a speciilor de *Enchytraeus*

Enchitreidele din specia *Enchytraeus albidus* (precum și alte specii de *Enchytraeus*) pot fi crescute în cutii mari de plastic (de exemplu  $30 \times 60 \times 10$  cm) umplute cu un amestec 1:1 de sol artificial și sol de grădină natural necontaminat. Trebuie evitată utilizarea compostului deoarece acesta poate conține substanțe chimice toxice, cum ar fi metale grele. Fauna trebuie eliminată din sol înainte de utilizare (de exemplu, prin congelare). Se poate utiliza și un substrat format doar din sol artificial, însă rata de reproducere poate fi mai mică decât cea obținută cu un substrat de sol amestecat. Substratul utilizat pentru cultură trebuie să aibă un pH de  $6,0 \pm 0,5$ .

Cultura se păstrează la întuneric, la o temperatură de  $15-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Trebuie evitate temperaturile mai mari de  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Solul trebuie menținut umed, dar nu ud. Conținutul de umiditate corect este indicat de apariția unor mici picături de apă între degete atunci când solul este strâns ușor în mână. Crearea de condiții anoxice trebuie evitată prin asigurarea faptului că recipientele de cultură permit un schimb de gaze adecvat cu atmosfera. Solul trebuie întors cu grijă săptămânal pentru a facilita aerarea.

Viermii pot fi hrăniți cu fulgi de ovăz. Fulgii de ovăz trebuie păstrați în vase închise ermetic și autoclavați sau încălziți înainte de utilizare pentru a evita infecțiile cu acarieni de făină (de exemplu, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) sau cu acarieni prădători [de exemplu, *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. După tratamentul termic, hrana trebuie măcinată pentru a putea fi ușor împrăștiată pe suprafața solului. Din când în când, fulgii de ovăz pot fi suplimentați cu vitamine, lapte și ulei de ficat de cod. Alte surse adecvate de hrană sunt drojdia de panificație și hrana pentru pești „Tetramin”.

Administrarea hranei se face aproximativ de două ori pe săptămână. O cantitate adecvată de fulgi de ovăz se împrăștie pe suprafața solului sau se amestecă cu grijă în substrat atunci când se întoarce solul pentru a facilita aerarea. Cantitatea absolută de hrană furnizată depinde de numărul de viermi prezenți în substrat. Cu titlu orientativ, cantitatea de hrană trebuie crescută dacă este consumată în decurs de o zi de la administrare. Invers, dacă pe suprafața solului încă mai există hrană la momentul celei de a doua administrări de hrană (o săptămână mai târziu), cantitatea trebuie redusă. Hrana contaminată cu ciuperci trebuie eliminată și înlocuită. După trei luni, viermii trebuie transferați într-un substrat proaspăt.

Condițiile de cultură sunt considerate satisfăcătoare dacă viermii: (a) nu încearcă să părăsească substratul, (b) se mișcă repede prin sol, (c) prezintă o suprafață exterioară lucioasă, fără particule de sol lipite, (d) au o culoare mai mult sau mai puțin albicioasă (e) prezintă o varietate de intervale de vârstă în culturi și (f) se reproduc continuu.

## ▼ M6

## Apendicele 5

Desfășurarea testului cu alte specii de *Enchytraeus*

## Alegerea speciei

Pot fi utilizate și alte specii decât *E. albidus*, însă procedura de testare și criteriile de validitate trebuie adaptate în consecință. Întrucât multe specii de *Enchytraeus* sunt ușor disponibile și pot fi întreținute în mod satisfăcător în laborator, cel mai important criteriu pentru selectarea unei alte specii decât *E. albidus* este relevanța ecologică și, în plus, sensibilitatea comparabilă. Schimbarea speciei poate avea și motive oficiale. De exemplu, în țările în care nu există și nu se poate importa *E. albidus* (de exemplu, din cauza unor restricții de carantină), va fi necesară utilizarea unei alte specii de *Enchytraeus*.

## Exemple de specii alternative adecvate

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): în ultimii ani, această specie a fost deseori folosită în studii ecotoxicologice datorită ușurinței înmulțirii și testării. Cu toate acestea, este vorba despre un vierme mic, ceea ce face manipularea mai dificilă în comparație cu *E. albidus* (în special în etapele anterioare utilizării metodei de colorare). Nu s-a dovedit cu certitudine existența *E. crypticus* în natură, specia fiind descrisă numai în culturi de răme. Prin urmare, nu se cunosc cerințele sale ecologice.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Această denumire acoperă probabil un grup de specii foarte apropiate care sunt dificil de distins din punct de vedere morfologic. Utilizarea sa pentru testare nu se recomandă decât după ce se poate identifica specia indivizilor utilizați într-un test. *E. buchholzi* trăiește de obicei în pajiști sau în locuri perturbate cum ar fi marginea drumurilor.
- *Enchytraeus luxuriosus*: această specie a fost cunoscută inițial ca *E. „minutus”*, însă a fost descrisă recent (1). A fost descoperită pentru prima dată de U. Graefe (Hamburg) pe o pajiște din apropiere de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Germania). *E. luxuriosus* are aproximativ jumătate din dimensiunea *E. albidus*, însă este mai mare decât alte specii discutate în prezentul apendice; această caracteristică o poate transforma într-o bună specie pentru înlocuirea *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): această specie a fost raportată până acum pentru solurile minerale din Germania și Spania, unde este o specie obișnuită, însă de obicei nu foarte abundentă. Spre deosebire de alte specii mici din acest gen, este relativ ușor de identificat. Nu există informații despre comportamentul său în testele de laborator sau despre sensibilitatea sa la substanțele chimice. Cu toate acestea, s-a constatat că este o specie ușor de crescut (E. Belotti, comunicare personală).

## Condiții de înmulțire

Toate speciile de *Enchytraeus* menționate mai sus pot fi crescute în aceleași substraturi utilizate pentru *E. albidus*. Având în vedere dimensiunea lor mai mică, vasele de cultură pot fi mai mici și, deși se poate utiliza aceeași hrană, rația trebuie să fie ajustată. Ciclul de viață al acestor specii este mai scurt decât în cazul *E. albidus*, iar administrarea hranei trebuie efectuată mai frecvent.

## Condiții de testare

Condițiile de testare sunt în general ca cele aplicabile pentru *E. albidus*, cu următoarele excepții:

- dimensiunea vasului de testare poate (dar nu trebuie) să fie mai mică;
- durata testului de reproducere poate (dar nu trebuie) să fie mai mică, adică patru în loc de șase săptămâni; cu toate acestea, durata testului de stabilire a intervalului nu trebuie modificată;
- având în vedere dimensiunea mică a viermilor tineri, utilizarea metodei de colorare este foarte recomandată pentru numărare;
- criteriul de validitate legat de „numărul de viermi tineri din fiecare vas de testare din proba de control” trebuie schimbat cu „50”.

▼ **M6**

BIBLIOGRAFIE

- (1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57, 93-100.

▼ **M6***Apendicele 6***Descriere detaliată a tehnicilor de extracție****Colorarea cu roșu Bengal**

Această metodă, dezvoltată inițial în ecologia limnică (1) a fost propusă pentru prima dată în scopul numărării enchitreidelor tinere din testul de reproducere a enchitreidelor de W. de Coen (Universitatea din Ghent, Belgia). O versiune modificată (roșu Bengal amestecat cu formaldehidă în loc de etanol) a fost dezvoltată independent de RIVM Bilthoven (2)(3).

La sfârșitul testului final (adică după șase săptămâni), solul din vasele de testare se transferă într-un recipient cu adâncime mică. În acest scop este util un vas Bellaplast sau un bazin fotografic cu fund canelat, cel din urmă, datorită canelurilor, împiedică deplasarea viermilor în câmpul de observație. Viermii tineri sunt fixați cu etanol (aproximativ 5 ml per probă duplicat). Vasele se umplu apoi cu apă până la un strat de 1-2 cm. Se adaugă câteva picături (200-300  $\mu$ l) de roșu Bengal (soluție de 1 % în etanol) (0,5 % eozină este o altă opțiune) după care cele două componente se amestecă cu grijă. După 12 ore, viermii ar trebui să aibă pete de culoare roșiatică și ar trebui să fie ușor de numărat deoarece se vor afla pe suprafața substratului. Alternativ, amestecul substrat/alcool poate fi spălat printr-o sită (dimensiunea ochiurilor: 0,250 mm) înainte de numărarea viermilor. Utilizând această procedură, caolinitul, turba și o parte din nisip vor fi îndepărtate prin spălare, iar viermii de culoare roșiatică vor fi mai ușor de văzut și de numărat. Utilizarea unor lupe iluminate (dimensiune a lupei de 100  $\times$  75 mm cu un factor de mărire de 2-3) va facilita, de asemenea, număratoarea.

Tehnica colorării reduce timpul de numărare la câteva minute pentru fiecare vas și, orientativ, ar trebui să fie posibil ca o singură persoană să evalueze toate vasele din cadrul unui test în maximum două zile.

**Extracția umedă**

Extracția umedă trebuie începută imediat după încheierea testului. Solul din fiecare vas de testare se pune în site de plastic cu o dimensiune a ochiurilor de aproximativ 1 mm. Sitele se suspendă apoi în boluri de plastic, fără a atinge fundul. Bolurile se umplu atent cu apă până când probele din site se află în întregime sub suprafața apei. Pentru a asigura o rată de recuperare de peste 90 % dintre viermii prezenți, trebuie utilizată o perioadă de extracție de 3 zile la 20  $\pm$  2 °C. La finalul perioadei de extracție, sitele se scot, iar apa (cu excepția unei cantități mici) se decantează ușor, având grijă să nu se agite sedimentul de pe fundul bolurilor. Ulterior, bolurile de plastic se agită ușor pentru a pune sedimentul în suspensie în apa de deasupra. Apa se transferă într-o cutie Petri și, după ce particulele de sol se depun, enchitreidele pot fi identificate, scoase și numărate utilizând un stereomicroscop și o pensetă fină din oțel.

**Flotația**

O metodă bazată pe flotație a fost descrisă într-o notă de R. Kuperman (4). După fixarea conținutului unui vas de testare cu etanol, solul se inundă cu Ludox (silice coloidală AM-30, suspensie apoasă de 30 % în greutate) până la 10-15 mm deasupra suprafeței solului. După o amestecare completă a solului cu agentul de flotație timp de 2-3 minute, viermii tineri care plutesc la suprafață pot fi numărați cu ușurință.

**BIBLIOGRAFIE**

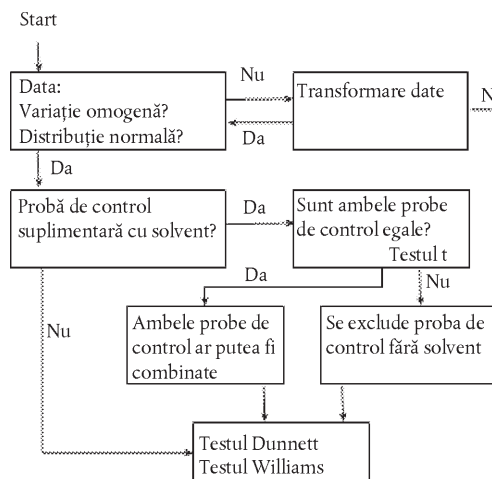
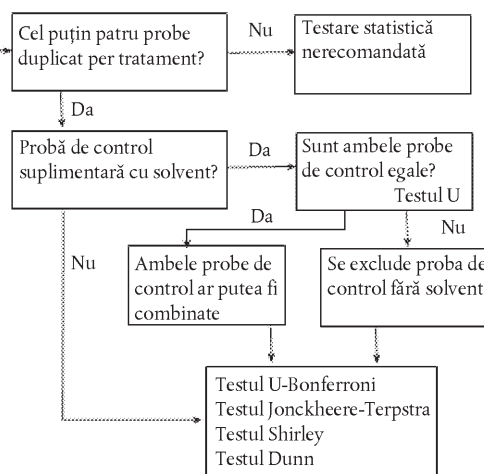
- (1) Korinkova, J. și Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* **32**, 300-305.

**▼ M6**

- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. și Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta, Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (3) Postuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. și Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* **38**, 108-121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. și Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19<sup>th</sup> Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼ **M6**

## Apendicele 7

**Prezentare generală a evaluării statistice a datelor (determinarea NOEC)****Teste parametrice****Teste neparametrice**

▼ **M6****C.33. TEST DE REPRODUCERE A RÂMELOR (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)**

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 222 (2004). Aceasta este concepută pentru evaluarea efectelor substanțelor chimice din sol asupra ratei de reproducere (și a altor puncte finale subletale) a speciei de răme *Eisenia fetida* (Savigny 1826) sau *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Testul a făcut obiectul unui ring test (3). Există o metodă de testare a toxicității acute asupra rămelor (4). S-au publicat numeroase alte orientări internaționale și naționale pentru testele de toxicitate acută și cronică asupra rămelor (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* este considerat unul dintre reprezentanții faunei din sol și, în special, al rămelor. Sunt disponibile informații de referință privind ecologia rămelor și utilizarea acestora în cadrul testelor ecotoxicologice (7)(9)(10)(11)(12).

## PRINCIPIUL TESTULUI

3. Rămele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare, fie amestecată în sol, fie, în cazul pesticidelor, aplicată în sau pe sol utilizând proceduri conforme cu modelul de utilizare a substanței chimice respective. Metoda de aplicare depinde de scopul testului. Seria de concentrații de testare este selectată pentru a include concentrațiile susceptibile de a cauza efecte subletale și letale pe parcursul unei perioade de opt săptămâni. Mortalitatea și efectele asupra creșterii la rămele adulte sunt determinate după 4 săptămâni de expunere. Adulții sunt apoi extrași din sol, iar efectele asupra reproducerii sunt evaluate după alte 4 săptămâni prin calcularea numărului de descendenți prezenți în sol. Rata de reproducere a rămelor expuse la substanța chimică de testare este comparată cu cea din proba (probele) de control în vederea determinării (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau a (ii) valorii  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) utilizând un model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza o reducere cu x % a ratei de reproducere. Concentrațiile de testare trebuie să acopere valoarea  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) astfel încât valoarea  $EC_x$  să fie mai degrabă interpolată decât extrapolată (pentru definiții, a se vedea appendicele 1).

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

4. Trebuie să fie disponibile următoarele informații privind substanța chimică de testare pentru a putea defini procedurile de testare corespunzătoare:
  - solubilitatea în apă;
  - $\log K_{ow}$ ;
  - presiunea de vapori;
  - și informații privind evoluția și comportamentul în mediu, dacă este posibil (de exemplu, viteza de fotoliză și viteza de hidroliză în cazul în care acestea sunt relevante pentru modelele de aplicare).
5. Această metodă de testare se aplică tuturor substanțelor chimice de testare, indiferent de solubilitatea lor în apă. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, definite ca fiind substanțe chimice în cazul cărora constanta lui Henry sau coeficientul de partiție sol/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.
6. Prezenta metodă de testare nu ia în considerare posibila degradare a substanței chimice de testare pe parcursul testului. În consecință, nu se poate garanta menținerea concentrațiilor de expunere la valorile inițiale pe tot parcursul testului. În acest caz, se recomandă efectuarea unei analize chimice a substanței chimice de testare la începutul și la finalul testului.



**▼ M6****SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

7. Trebuie determinată valoarea NOEC și/sau EC<sub>x</sub> a unei substanțe chimice de referință pentru a garanta caracterul adecvat al condițiilor de testare din laborator și pentru a verifica regularitatea în timp din punct de vedere statistic a răspunsului organismelor de testare. Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin o dată pe an sau, dacă testarea se desfășoară la o frecvență mai redusă, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare. Carbendazimul și benomilul reprezintă substanțe chimice de referință corespunzătoare care au demonstrat că afectează reproducerea (3). Trebuie observate efecte semnificative între (a) 1 și 5 mg de ingredient activ/kg de masă uscată sau (b) 250-500 g/ha sau 25-50 mg/m<sup>2</sup>. În cazul în care un standard toxic pozitiv este inclus în seria de testare, se utilizează o singură concentrație, iar numărul de probe duplicat trebuie să fie același cu cel al probelor de control.

**VALIDITATEA TESTULUI**

8. Pentru ca rezultatul unui test să fie considerat valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii:
- fiecare probă duplicat (conținând 10 adulți) trebuie să fi produs  $\geq 30$  de exemplare tinere la finalul testului;
  - coeficientul de variație al reproducerii trebuie să fie  $\leq 30\%$ ;
  - rata mortalității în rândul adulților pe parcursul celor 4 săptămâni inițiale ale testului trebuie să fie  $\leq 10\%$ .

În cazul în care un test nu îndeplinește criteriile de validitate de mai sus, testul trebuie încheiat, cu excepția cazului în care poate fi oferită o justificare pentru continuarea acestuia. Justificarea trebuie inclusă în raport.

**DESCRIEREA TESTULUI****Echipamente**

9. Trebuie utilizate recipiente de testare din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert cu o capacitate de aproximativ unu până la doi litri. Recipientele trebuie să aibă o secțiune orizontală de aproximativ 200 cm<sup>2</sup> astfel încât să se obțină o adâncime a substratului umed de aproximativ 5-6 cm atunci când se adaugă 500-600 g de masă uscată de substrat. Modelul capacului recipientului trebuie să permită schimbul de gaze între substrat și atmosferă și accesul luminii (de exemplu, prin intermediul unui capac transparent perforat) fără să permită ieșirea rămelor din recipient. În cazul în care cantitatea de substrat de testare utilizată este mult mai mare de 500-600 g per recipient de testare, numărul de răme trebuie crescut proporțional.
10. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă, în special, următoarele:
- dulap pentru uscare;
  - stereomicroscop;
  - pH-metru și fotometru;
  - cântare de precizie adecvate;
  - echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;
  - echipamente adecvate pentru controlul umidității (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt prevăzute cu capace);
  - incubator sau o cameră mică prevăzută cu sistem de climatizare;
  - pensete, cârlige sau anse;
  - baie de apă.

## ▼ M6

**Pregătirea solului artificial**

11. În cadrul acestui test se utilizează un sol artificial (5)(7) având următoarea compoziție (pe baza greutateii uscate, uscat la o temperatură de 105 °C până la obținerea unei greutăți constante):

- 10 % mușchi de turbă (cu pH-ul cât mai apropiat posibil de valoarea de 5,5-6,0, fără reziduuri vizibile de plante, fin măcinat, uscat până la atingerea unui grad de umiditate măsurat);
- 20 % argilă caolinică (cu un conținut de caolinit de preferat mai mare de 30 %);
- 0,3-1,0 % carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, de puritate analitică) pentru a obține un pH inițial de  $6,0 \pm 0,5$ .
- 70 % nisip cuarțos uscat cu aer (în funcție de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni.

*Nota 1:* cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară va depinde de componentele substratului de sol, inclusiv hrana, și trebuie determinată prin măsurarea subșanțioanelor de sol chiar înainte de test. pH-ul este măsurat într-o probă amestecată într-o soluție 1 M de clorură de potasiu (KCl) sau într-o soluție de 0,01 M de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) (13).

*Nota 2:* conținutul de carbon organic al solului artificial poate fi redus, de exemplu, prin scăderea conținutului de turbă la 4-5 % și prin creșterea în consecință a conținutului de nisip. Printr-o astfel de reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de absorbție a substanței chimice de testare în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice de testare pentru răme. S-a demonstrat că *Eisenia fetida* poate satisface criteriile de validitate privind reproducerea când este testată pe soluri naturale cu conținut mai scăzut de carbon organic (de exemplu 2,7 %) (14) și s-a constatat experimental că aceasta se poate obține și în soluri artificiale cu 5 % turbă. Prin urmare, nu este necesar ca înainte de utilizarea unui astfel de sol în cadrul unui test final să se demonstreze caracterul adecvat al solului artificial pentru a permite conformitatea testului cu criteriile de validitate, cu excepția cazului în care conținutul de turbă este mai mic decât valorile specificate mai sus.

*Nota 3:* când se utilizează sol natural în cadrul unui test suplimentar (de exemplu, la un nivel superior), trebuie, de asemenea, să se demonstreze caracterul adecvat al solului și îndeplinirea criteriilor de validitate.

12. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare) într-un spațiu bine ventilat. Înainte de începerea testului, solul artificial uscat este umezit prin adăugarea de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, reprezentând între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei (corespunzând cu  $50 \pm 10$  % din masa uscată umezită). Astfel, se obține un substrat din care nu se scurge apă stătătoare sau liberă atunci când este strâns în mână. Capacitatea de retenție a apei (WHC) maximă a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 2, ISO 11274 (15) sau un standard UE echivalent.
13. În cazul în care substanța chimică de testare se aplică pe suprafața solului sau este amestecată în sol fără apă, cantitatea finală de apă poate fi amestecată în solul artificial în timpul pregătirii solului. În cazul în care substanța chimică de testare este amestecată în sol împreună cu o anumită cantitate de apă, se poate adăuga o cantitate de apă suplimentară în același timp cu substanța chimică de testare (a se vedea punctul 19).
14. Gradul de umiditate din sol este determinat la începutul și la finalul testului în conformitate cu ISO 11465 (16) sau cu un standard UE echivalent, iar pH-ul solului, în conformitate cu apendicele 3 sau cu ISO 10390 (13) sau cu un standard UE echivalent. Aceste determinări trebuie efectuate pe o probă

▼ **M6**

de sol de control și pe o probă de sol cu fiecare concentrație de testare. pH-ul solului nu trebuie ajustat atunci când sunt testați acizi sau baze. Gradul de umiditate trebuie să fie monitorizat pe întreaga perioadă a testului prin cântărirea periodică a recipientelor (a se vedea punctele 26 și 30).

**Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare**

15. Specia utilizată în cadrul testului este *Eisenia fetida* sau *Eisenia andrei* (1)(2). Pentru a începe testul sunt necesare râmele adulte cu vârsta între două luni și un an și cu un clitellum. Râmele trebuie să fie selectate dintr-o cultură sincronizată cu o structură de vârstă relativ omogenă (apendicele 4). Exemplarele dintr-un grup de testare nu trebuie să difere din punctul de vedere al vârstei cu mai mult de 4 săptămâni.
16. Râmele selectate trebuie să se aclimatizeze timp de cel puțin o zi cu tipul de substrat de sol artificial pentru a fi utilizate în cadrul testului. În această perioadă râmele trebuie să fie hrănite cu același tip de hrană care va fi utilizat în cadrul testului (a se vedea punctele 31-33).
17. Grupuri de câte 10 râme trebuie cântărite individual, repartizându-le aleatoriu în recipientele de testare în momentul începerii testului. Râmele sunt spălate înainte de cântărire (cu apă deionizată), iar excesul de apă se îndepărtează prin așezarea pentru scurt timp a râmelor pe hârtie de filtru. Masa umedă a fiecărei râme trebuie să fie cuprinsă între 250 și 600 mg.

**Pregătirea concentrațiilor de testare**

18. Pot fi utilizate două metode de aplicare a substanței chimice de testare: amestecarea substanței chimice de testare în sol (a se vedea punctele 19-21) sau aplicarea pe suprafața solului (a se vedea punctele 22-24). Selectarea metodei adecvate depinde de scopul testului. În general, se recomandă amestecarea substanței chimice de testare în sol. Cu toate acestea, se pot impune proceduri de aplicare conforme cu practica agricolă obișnuită (de exemplu, pulverizarea preparatelor lichide sau utilizarea de preparate speciale de pesticide precum granule sau produse de tratare a semințelor). Solvenții utilizați pentru facilitarea tratamentului solului cu substanța chimică de testare trebuie selectați pe baza toxicității lor scăzute pentru râme și trebuie inclus în proiectul de testare un vas de control cu solvent (a se vedea punctul 27).

**Amestecarea substanței chimice de testare în sol***Substanța chimică de testare solubilă în apă*

19. O soluție a substanței chimice de testare este pregătită în apă deionizată, chiar înainte de începerea testului, într-o cantitate suficientă pentru toate probele duplicat cu aceeași concentrație. Poate fi necesar un cosolvent pentru a facilita prepararea soluției de testare. Este de preferat să se pregătească o cantitate de soluție necesară pentru a atinge gradul final de umiditate (între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei). Soluția este amestecată bine cu substratul de sol înainte de a fi introdusă într-un recipient de testare.

*Substanța chimică de testare insolubilă în apă*

20. Substanța chimică de testare se dizolvă într-un volum mic de solvent organic adecvat (de exemplu acetona) și apoi este pulverizată pe o cantitate mică de nisip cuarțos fin sau este amestecată în acesta. Solventul este apoi eliminat prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin câteva minute. Nisipul tratat este apoi amestecat bine cu solul artificial umezit în prealabil. Se adaugă apoi apă deionizată (o cantitate necesară) pentru a atinge un grad final de umiditate cuprins între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei și se amestecă în sol. Solul este gata pentru a fi introdus în recipientele de testare. Trebuie să se aibă în vedere faptul că anumiți solvenți pot fi toxici pentru râme.

▼ **M6***Substanța chimică de testare insolubilă în apă și solvenți organici*

21. Se prepară un amestec format din 10 g de nisip cuarțos industrial fin măcinat și o cantitate de substanță chimică de testare necesară pentru a atinge concentrația de testare în sol. Amestecul este apoi mixat bine cu solul artificial umezit în prealabil. Se adaugă apoi apă deionizată într-o cantitate necesară pentru a atinge un grad final de umiditate cuprins între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei și se amestecă în sol. Solul este gata pentru a fi introdus în recipientele de testare.

*Aplicarea substanței chimice de testare pe suprafața solului*

22. Solul este tratat după introducerea rămelor. Recipientele de testare sunt primele care trebuie umplute cu substratul de sol umezit, iar rămele cântărite sunt așezate pe suprafața acestuia. Rămele sănătoase pătrund în mod normal imediat în substrat și, prin urmare, orice rămă rămasă la suprafață după 15 minute este considerată bolnavă și trebuie înlocuită. Dacă rămele sunt înlocuite, cele noi și cele înlocuite trebuie cântărite astfel încât să se cunoască de la început greutatea totală în viu a grupului de răme destinate expunerii și greutatea totală a recipientului cu răme.
23. Se aplică substanța chimică de testare. Aceasta nu trebuie să fie adăugată la sol în prima jumătate de oră de la introducerea rămelor (sau dacă rămele sunt prezente pe suprafața solului), pentru a se evita orice expunere directă la substanța chimică de testare prin contact cutanat. Atunci când substanța chimică de testare este un pesticid, poate fi adecvată aplicarea acesteia pe suprafața solului prin pulverizare. Substanța chimică de testare trebuie aplicată pe suprafața solului, în mod cât mai uniform posibil, cu ajutorul unui dispozitiv de pulverizare de laborator pentru a simula pulverizarea pe teren. Înainte de aplicare capacul recipientului de testare trebuie să fie îndepărtat și înlocuit cu un înveliș care protejează pereții laterali ai recipientului în timpul pulverizării. Învelișul poate fi realizat dintr-un recipient de testare de la care a fost îndepărtată baza. Aplicarea trebuie să aibă loc la o temperatură de  $20 \pm 2$  °C și pentru soluțiile apoase, emulsii sau dispersii la o rată de aplicare a apei cuprinsă între 600 și 800  $\mu\text{l}/\text{m}^2$ . Rata trebuie să fie verificată cu ajutorul unei tehnici de calibrare adecvate. Preparatele speciale precum granulele sau produsele de tratare a semințelor trebuie aplicate într-un mod similar cu modul de aplicare în agricultură.
24. Recipientele de testare trebuie să fie lăsate neacoperite timp de o oră pentru a permite oricărui solvent volatil asociat cu aplicarea substanței chimice de testare să se evapore. Trebuie avut grijă ca nicio rămă să nu scape din vasele de testare în perioada respectivă.

**PROCEDURA****Grupuri de testare și vase de control**

25. Se recomandă introducerea a 10 răme în 500-600 g de masă uscată de sol artificial (de exemplu, 50-60 g de sol per rămă). Dacă se utilizează cantități mari de sol, ca în cazul testării pesticidelor cu moduri speciale de aplicare, cum ar fi produsele de tratare a semințelor, cantitatea de 50-60 g de sol per rămă trebuie menținută prin creșterea numărului de răme. Se pregătesc zece răme pentru fiecare recipient de control și de tratament. Rămele sunt spălate cu apă și șterse și sunt așezate apoi pe hârtie absorbantă pentru o perioadă scurtă pentru a permite scurgerea excesului de apă.
26. Pentru a evita erorile sistematice în distribuirea rămelor în recipientele de testare, omogenitatea populației de testare trebuie să fie determinată prin cântărire individuală a 20 de răme prelevate aleatoriu din populația din care vor fi selectate rămele pentru testare. După asigurarea omogenității, loturile de răme sunt apoi selectate, cântărite și distribuite în recipientele de testare utilizând o procedură de randomizare. După adăugarea rămelor de

**▼ M6**

testare, fiecare recipient de testare trebuie să fie cântărit pentru a se asigura că există o greutate inițială care poate fi utilizată ca bază pentru monitorizarea gradului de umiditate a solului pe toată durata testului, conform descrierii de la punctul 30. Recipientele de testare sunt apoi acoperite conform descrierii de la punctul 9 și așezate în camera de testare.

27. Sunt pregătite vase de control corespunzătoare pentru fiecare dintre metodele de aplicare a substanței chimice de testare descrise la punctele 18-24. Pentru pregătirea probelor de control sunt urmate procedurile relevante descrise, fără a se adăuga substanța chimică de testare. Astfel, dacă este cazul, se adaugă în probele de control solvenți organici, nisip cuarțos sau alți dizolvanți în concentrații/cantități echivalente cu cele utilizate în vasele de tratament. Atunci când se utilizează un solvent sau un alt dizolvant pentru a adăuga substanța chimică de testare, trebuie pregătită și testată, de asemenea, o probă de control suplimentară fără dizolvant sau substanța chimică de testare pentru a se asigura că dizolvantul nu influențează rezultatele testului.

**Condiții de testare**

28. Temperatura de testare este de  $20 \pm 2$  °C. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în zona recipientelor de testare.
29. Recipientele de testare nu sunt aerate în timpul testului, dar modelul capacelor vaselor de testare trebuie să ofere posibilitatea schimbului de gaze, limitând totodată evaporarea umezelii (a se vedea punctul 9).
30. Conținutul de apă al substratului de sol în recipientele de testare este menținut pe toată durata testului prin recântărirea periodică a recipientelor de testare (fără capacele acestora). Dacă este necesar, pierderile sunt compensate cu apă deionizată. Conținutul de apă nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % față de cel de la începutul testului.

**Hrănirea**

31. Este considerat acceptabil orice tip de hrană de o calitate considerată adecvată cel puțin pentru menținerea greutății rămelor în timpul testului. Experiența a demonstrat că fulgii de ovăz și gunoiul de grajd provenit de la bovine sau cabaline constituie o hrană adecvată. Trebuie efectuate verificări pentru a se asigura că bovinele sau cabalinele de la care este obținut gunoiul de grajd nu sunt supuse unui tratament cu medicamente sau cu substanțe chimice, cum ar fi hormoni de creștere, nematocide sau produse de uz veterinar similare care ar putea afecta negativ rămele în timpul testului. Se recomandă colectarea individuală de gunoi de grajd de la bovine, deoarece experiența a arătat că gunoiul de grajd disponibil pe piață, utilizat ca îngrășământ de grădină, poate avea efecte adverse asupra rămelor. Gunoiul de grajd trebuie uscat cu aer, măcinat fin și pasteurizat înainte de utilizare.
32. Înainte de a fi utilizat în cadrul unui test, fiecare lot proaspăt de hrană trebuie administrat unei culturi de răme netestate pentru a se asigura că acesta este de o calitate corespunzătoare. Creșterea și producția de coconi nu trebuie reduse în comparație cu cele ale rămelor crescute într-un substrat care nu conține lotul nou de hrană [condițiile descrise în metoda de testare C.8(4)].
33. Hrana se administrează prima dată la o zi după introducerea rămelor și aplicarea substanței chimice de testare în sol. Aproximativ 5 g de hrană sunt distribuite pe suprafața solului din fiecare recipient și sunt umezite cu apă deionizată (aproximativ între 5 ml și 6 ml per recipient). Ulterior, hrana se administrează o dată pe săptămână pe parcursul perioadei de testare

**▼ M6**

de 4 săptămâni. În cazul în care există resturi de hrană neconsumată, rația trebuie redusă astfel încât să se evite dezvoltarea de ciuperci sau apariția de infecții fungice. Adulții sunt extrași din sol în cea de a 28-a zi a testului. Alte 5 g de hrană sunt apoi administrate în fiecare recipient de testare. Nu se mai administrează hrană pe parcursul celor 4 săptămâni rămase ale testului.

**Selectarea concentrațiilor de testare**

34. Informațiile anterioare cu privire la toxicitatea substanței chimice de testare, provenite, de exemplu, dintr-un test de toxicitate acută (4) și/sau dintr-o serie de studii de stabilire a intervalului, ar trebui să faciliteze selectarea concentrațiilor de testare adecvate. Dacă este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului, de exemplu, cu cinci concentrații de 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg (masă uscată a solului). Este suficientă o probă duplicat pentru fiecare tratament și pentru fiecare probă de control. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni, iar rata mortalității este evaluată la finalul testului.

**Proiectul experimentului**

35. Întrucât nu poate fi prescris pentru test niciun rezumat statistic, prezenta metodă de testare oferă instrucțiuni pentru determinarea valorilor NOEC și  $EC_x$ . Un calcul al NOEC ar putea fi solicitat de autoritățile de reglementare în viitorul apropiat. O utilizare pe scară mai largă a  $EC_x$ , determinată de rațiuni de natură statistică și ecologică, ar putea fi adoptată în viitorul apropiat. În consecință, sunt propuse trei modele, bazate pe recomandările formulate în urma unui ring test privind o metodă de testare a reproducerii enchitreidelor (17).

36. Pentru stabilirea intervalului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

- Pentru determinarea valorii NOEC, trebuie testate cel puțin cinci/douăsprezece concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 2,0.
- Pentru determinarea valorii  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ), se recomandă utilizarea unui număr adecvat de concentrații pentru a obține cel puțin patru răspunsuri medii semnificativ diferite din punct de vedere statistic la aceste concentrații. Se recomandă cel puțin două probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și șase probe duplicat de control. Factorul de separare poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în seria de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrațiile cele mai mari și cele mai scăzute.
- O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și  $EC_x$ . Trebuie utilizate opt concentrații de tratament în serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare tratament și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

**Durata testului și măsurători**

37. În cea de a 28-a zi, râmele adulte vii sunt observate și numărate. Se înregistrează, de asemenea, orice comportament neobișnuit (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată) și orice modificare a morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise). Toate râmele adulte se scot apoi din vasele de testare și sunt numărate și cântărite. Transferul, înainte de evaluare, al solului care conține râmele într-o tavă curată poate facilita căutarea adulților. Râmele extrase din sol trebuie spălate înainte de cântărire (cu apă deionizată), iar excesul de apă se îndepărtează prin așezarea pentru scurt timp a râmelor pe hârtie de filtru. Toate râmele care nu sunt găsite în această perioadă sunt înregistrate ca moarte, întrucât se presupune că respectivele râme au murit și s-au descompus înainte de evaluare.

**▼ M6**

38. În cazul în care a fost scos din recipient, solul trebuie apoi reintrodus în acestea (fără rămele adulte, însă cu toți coconii produși). Solul este apoi incubat timp de patru săptămâni suplimentare în aceleași condiții de testare, cu excepția faptului că hrana este administrată doar la începutul acestei faze a testului (a se vedea punctul 33).
39. La finalul celei de a doua perioade de 4 săptămâni, se determină numărul de exemplare tinere eclozate din coconii din solul de testare și numărul de coconi utilizându-se procedurile descrise în apendicele 5. Toate semnele de rănire sau de vătămare a rămelor trebuie, de asemenea, înregistrate pe tot parcursul perioadei de testare.

**Test la valori-limită**

40. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere va fi efectuat sub forma unui test la valori-limită, utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg. Un test la valori-limită va oferi posibilitatea de a demonstra că NOEC pentru reproducere este mai mare decât concentrația-limită, diminuând în același timp numărul rămelor utilizate în cadrul testului. Trebuie utilizate opt probe duplicate atât pentru solul tratat, cât și pentru proba de control.

**DATE ȘI RAPORT****Prelucrarea rezultatelor**

41. Cu toate că în apendicele 6 este furnizată o prezentare generală, în cadrul prezentei metode de testare nu este oferită nicio orientare statistică definitivă pentru analiza rezultatelor testului.
42. Unul dintre punctele finale este mortalitatea. Cu toate acestea, modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) rămelor adulte trebuie, de asemenea, înregistrate împreună cu prezența oricărui exemplar tânăr. De obicei, trebuie aplicată analiza probit (18) sau regresia logistică pentru determinarea  $LC_{50}$ . Cu toate acestea, în cazurile în care această metodă de analiză nu este adecvată (de exemplu, dacă sunt disponibile mai puțin de trei concentrații având ca efect mortalitatea parțială), pot fi utilizate metode alternative. Aceste metode ar putea include mediile mobile (19), metoda simplificată Spearman-Kärber (20) sau simpla interpolare (de exemplu, media geometrică a  $LC_0$  și  $LC_{100}$ , calculată prin înmulțirea rădăcinii pătrate a  $LC_0$  cu  $LC_{100}$ ).
43. Celălalt punct final este fecunditatea (de exemplu, numărul de exemplare tinere produse). Cu toate acestea, ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne de nocivitate trebuie înregistrate în raportul final. Pentru a calcula rezultatele reproducerii, analiza statistică necesită cunoașterea mediei aritmetice  $\bar{x}$  și a abaterii standard per tratament și per probă de control.
44. Dacă s-a efectuat o analiză a varianței, abaterea standard,  $s$ , și gradele de libertate ( $df$ ) pot fi înlocuite de estimarea varianței combinate obținute din ANOVA și, respectiv, de gradele sale de libertate, cu condiția ca varianța să nu depindă de concentrație. În acest caz, se utilizează varianțele unice ale probelor de control și ale probelor supuse tratamentului. Respectivale valori se calculează de obicei cu ajutorul unui software statistic comercial utilizând ca duplicat rezultatele pentru fiecare vas. În cazul în care combinarea datelor pentru probele de control negative și pentru probele de control cu solvent pare rezonabilă în locul testării în funcție de una dintre ele, acestea trebuie testate pentru a vedea dacă nu diferă în mod semnificativ (pentru testul adecvat, a se vedea punctul 47 și apendicele 6).
45. Testarea statistică și inferența suplimentare depind de distribuția normală și omogenitatea în ceea ce privește varianța ale valorilor duplicate.



▼ **M6****Estimarea NOEC**

46. Ar fi de preferat aplicarea unor teste puternice. Trebuie utilizate informații, de exemplu, din experiența anterioară din cadrul ring testelor sau alte date istorice cu privire la distribuția aproximativ normală a datelor. Omogenitatea varianței (omoscedasticitatea) este mai critică. Experiența arată că varianța crește adesea odată cu creșterea mediei. În aceste cazuri, o transformare a datelor ar putea duce la homoscedasticitate. Cu toate acestea, o astfel de transformare trebuie să se bazeze pe experiența legată de datele istorice mai degrabă decât pe datele supuse analizei. Cu date omogene, ar trebui efectuate teste  $t$  multiple cum ar fi testul Williams ( $\alpha = 0,05$ , unilateral) (21)(22) sau, în anumite cazuri, testul lui Dunnett (23)(24). Trebuie remarcat faptul că, în cazul unei duplicări inegale, valorile  $t$  din tabel trebuie corectate astfel cum sugerează Dunnett și Williams. Uneori, din cauza variației mari, răspunsurile nu cresc/descresc în mod regulat. În acest caz de abatere puternică de la monotonicitate, testul lui Dunnett este mai adecvat. În cazul în care există abateri de la homoscedasticitate, ar putea fi rezonabilă analizarea mai aprofundată a posibilelor efecte asupra varianțelor pentru a decide dacă testele  $t$  pot fi aplicate fără a pierde multă putere (25). În mod alternativ, un test  $U$  multiplu, de exemplu testul  $U$  al lui Bonferroni potrivit Holm (26), sau, când aceste date prezintă heteroscedasticitate, dar din alte puncte de vedere corespund unei relații doză-răspuns monotonă subiacentă, poate fi aplicat un alt test neparametric [de exemplu, Jonckheere-Terpstra (27) (28) sau Shirley (29) (30)] și ar fi în general de preferat testelor  $t$  cu varianță inegală. (a se vedea, de asemenea, schema din apendicele 6).
47. Dacă s-a efectuat un test la valori-limită, iar premisele procedurilor de testare parametrică (normalitate, omogenitate) sunt îndeplinite, poate fi utilizat testul  $t$  (Student) pe perechi sau testul  $U$  Mann-Whitney (31).

**Estimarea  $EC_x$** 

48. Pentru a calcula orice valoare a  $EC_x$ , se utilizează mediile pentru fiecare tratament pentru analiza regresiei (liniară sau neliniară), după obținerea unei funcții doză-răspuns. Pentru creșterea râmelor ca răspuns continuu, valorile  $EC_x$  pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată (32). Printre funcțiile potrivite pentru datele binare (mortalitate/supraviețuire) și număr de descendenți produs se numără funcția sigmoidă normală, funcția logistică și funcția Weibull, conținând doi sau patru parametri, dintre care unii pot modela și răspunsurile hormetice. Dacă s-a stabilit o funcție doză-răspuns prin analiză de regresie liniară, trebuie identificat un  $r^2$  (coeficient de determinare) și/sau o pantă semnificativă în analiza de regresie înainte de a estima  $EC_x$  prin introducerea unei valori corespunzătoare  $x$  % din media probelor de control în ecuația obținută prin analiza de regresie. Limitele de încredere de 95 % se calculează după metoda lui Fieller [citată de Finney (18)] sau după alte metode moderne adecvate.
49. Alternativ, răspunsul se modelează ca procentaj sau proporție din parametrul modelului, care se interpretează ca răspuns mediu al probelor de control. În aceste cazuri, curba sigmoidă normală (logistică, Weibull) poate fi adesea ajustată la rezultate utilizând procedura de regresie probit (18). În aceste cazuri, funcția de ponderare trebuie ajustată pentru răspunsurile metrice potrivit lui Christensen (33). Cu toate acestea, dacă se observă o ormeză, analiza probit ar trebui înlocuită cu o funcție logistică sau Weibull cu patru parametri, stabilită printr-o procedură de regresie neliniară (34). Dacă este imposibilă ajustarea unei funcții doză-răspuns adecvate la date, se pot utiliza metode alternative de estimare a  $EC_x$  și a limitelor sale de încredere, cum ar fi mediile mobile după Thompson (19) și procedura Spearman-Kärber simplificată (20).

**RAPORTUL DE TESTARE**

50. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:



▼ **M6***Substanța chimică testată:*

- o descriere definitivă a substanței chimice de testare, lotul de fabricație, lotul de ambalare și numărul CAS, puritatea;
- proprietățile substanței chimice de testare [de exemplu, log Kow, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și informații privind evoluția și comportamentul].

*Organismele de testare:*

- animalele de testare utilizate: specii, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de creștere;
- vârsta, intervalul de dimensiune (masa) al organismelor de testare.

*Condițiile de testare*

- detalii privind pregătirea solului de testare;
- capacitatea maximă a solului de retenție a apei;
- o descriere a tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice de testare în sol;
- detalii privind substanțele chimice auxiliare utilizate pentru administrarea substanței chimice de testare;
- detalii privind calibrarea echipamentului de pulverizare, dacă este cazul;
- descrierea protocolului și a procedurii de testare;
- dimensiunea recipientelor de testare și volumul solului de testare;
- condițiile de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;
- o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;
- pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și la sfârșitul testului.

*Rezultatele testului:*

- mortalitatea în rândul adulților (%) în fiecare recipient de testare la finalul primelor 4 săptămâni ale testului;
- masa totală a adulților la începutul testului în fiecare recipient de testare;
- modificările de greutate corporală ale adulților vii (% din greutatea inițială) din fiecare recipient de testare după primele patru săptămâni ale testului;
- numărul de exemplare tinere produse în fiecare recipient de testare la sfârșitul testului;
- o descriere a simptomelor evidente sau patologice sau a schimbărilor clare de comportament;
- rezultatele obținute cu substanța chimică de testare de referință;
- valorile LC<sub>50</sub>, NOEC și/sau EC<sub>x</sub> (de exemplu, EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>) pentru reproducere, în cazul în care unele dintre acestea sunt aplicabile cu intervale de încredere și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea acestora, toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor;
- un grafic al raportului doză/răspuns;
- rezultatele aplicabile fiecărui recipient de testare;

Abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*” is two biological species. *Megadriologica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. și J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Oblig. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 – 282.

▼ **M6**

- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. În: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) Capitolul C.8 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe râme.
- (5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. și J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3<sup>rd</sup> Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. În: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravi-metric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼ **M6**

- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3<sup>rd</sup> ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo și R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Toxicol. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; *Correction Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) 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.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. și F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2<sup>nd</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. și Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. și J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții**

În cadrul prezentei metode de testare se aplică următoarele definiții:

„**Substanță chimică**” înseamnă o substanță sau un amestec.

„**EC<sub>x</sub>**” (concentrația efectivă pentru un efect de x %) reprezintă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC<sub>50</sub> reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite. În cadrul prezentului test concentrațiile efective sunt exprimate ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului.

„**LC<sub>0</sub>**” (concentrație neletală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care nu ucide niciunul dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC<sub>0</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„**LC<sub>50</sub>**” (concentrație medie letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 50 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test LC<sub>50</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului.

„**LC<sub>100</sub>**” (concentrație în întregime letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 100 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC<sub>100</sub> este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„**LOEC**” (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) reprezintă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare care prezintă un efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ). În cadrul prezentului test LOEC este exprimată ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului. Toate concentrațiile de testare mai mari de LOEC trebuie să indice în mod normal un efect diferit din punct de vedere statistic de cel observat în cazul probei de control. Orice abatere de la cele sus-menționate trebuie justificată în raportul de testare.

„**NOEC**” (concentrația la care nu se observă niciun efect) reprezintă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare aflată imediat sub LOEC în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

**Rată de reproducere:** numărul mediu de exemplare tinere de râme produs raportat la numărul de adulți pe parcursul perioadei de testare.

„**Substanță chimică de testare**” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

▼ **M6***Apendicele 2***Determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei**

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei (WHC) este considerată a fi una adecvată. Aceasta este descrisă în anexa C la ISO DIS 11268-2 (1).

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru, se umple cu apă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită și uscată la o temperatură de 105 °C până ce se atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC (în \% din masa uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat în apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) ISO (International Organization for Standardisation ) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

**▼ M6***Apendicele 3***Determinarea pH-ului solului**

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (1).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M de puritate analitică. Ulterior, suspensia se agită bine timp de cinci minute și este lăsată să se sedimenteze timp de cel puțin 2 ore, însă nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).

**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

## ▼ M6

## Apendicele 4

**Creșterea *Eisenia fetida*/Eisenia andrei**

Creșterea este preferabil să fie efectuată într-o cameră climatică la o temperatură  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La această temperatură și cu o cantitate de hrană suficientă, râmele devin mature după aproximativ 2-3 luni.

Ambele specii pot fi înmulțite într-o gamă largă de deșeuri animale. Mediul de înmulțire recomandat este un amestec 50:50 gunoi de grajd provenit de la cai sau de la bovine și turbă. Trebuie realizate verificări pentru a se asigura că bovinele sau caii de la care este obținut gunoiul de grajd nu sunt supuse unui tratament cu medicamente sau cu substanțe chimice, cum ar fi hormoni de creștere, nematocide sau produse de uz veterinar similare care ar putea afecta negativ râmele în timpul testului. Se recomandă colectarea individuală de gunoi de grajd dintr-o sursă „ecologică”, deoarece experiența a arătat că gunoiul de grajd disponibil pe piață utilizat ca îngrășământ de grădină poate avea efecte adverse asupra râmelor. Mediul trebuie să aibă o valoare a pH-ului de aproximativ 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu), o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mS/cm sau o concentrație de sare de 0,5 %) și nu trebuie să fie contaminat excesiv cu amoniac sau urină de origine animală. Substratul trebuie să fie umed, dar nu prea ud. Sunt recomandate cutii pentru înmulțire cu o capacitate de 10-50 litri.

Pentru a se obține râme cu o vârstă și o dimensiune (masă) standard, cel mai bine este să se înceapă cu creșterea de coconi. Odată ce cultura a fost creată, aceasta este menținută prin plasarea de râme adulte într-o cutie de înmulțire cu substrat proaspăt între 14 zile și 28 de zile pentru a permite producerea altor coconi. Adulții sunt apoi îndepărtați și exemplarele tinere produse din coconi sunt utilizate ca bază pentru cultura următoare. Râmele sunt hrănite continuu cu deșeuri animale și transferate la anumite intervale de timp în substrat proaspăt. Experiența a demonstrat gunoiul de grajd provenit de la bovine sau cai, uscat cu aer și fin mărunțit sau fulgii de ovăz constituie o hrană adecvată. Trebuie să se asigure că bovinele sau caii de la care este obținut gunoiul de grajd nu sunt supuși unui tratament cu medicamente sau cu substanțe chimice, cum ar fi hormoni de creștere, care ar putea afecta negativ râmele dintr-o cultură pe termen lung. Râmele eclozate din coconi sunt utilizate pentru teste atunci când au vârsta între 2 și 12 luni și sunt considerate adulte.

Râmele pot fi considerate sănătoase dacă se deplasează prin substrat, nu încearcă să părăsească substratul și se reproduc continuu. Epuizarea substratului este indicată de râmele care se deplasează foarte încet și care au o extremitate posterioară galbenă. În acest caz, se recomandă furnizarea de substrat proaspăt și/sau o reducere a densității populației de râme.

▼ **M6***Apendicele 5***Tehnici de numărare a exemplarelor tinere de râme eclozate din coconi**

Sortarea manuală a rămelor din substratul sol necesită foarte mult timp. Prin urmare, sunt recomandate două metode alternative:

- (a) Recipientele de testare sunt plasate într-o baie de apă inițial la o temperatură de 40 °C, dar care ajunge până la 60 °C. După o perioadă de aproximativ 20 de minute, exemplarele tinere de râme ar trebui să apară la suprafața solului de unde pot fi ușor extrase și numărate.
- (b) Solul de testare poate fi strecurat printr-o sită utilizând metoda dezvoltată de van Gestel et al. (1), cu condiția ca turba și gunoiul de grajd sau fulgii de ovăz adăugați în sol să fi fost măcinați într-o pulbere fină. Două site cu ochiuri de 0,5 mm (diametru de 30 cm) sunt așezate una peste cealaltă. Conținutul unui recipient de testare este strecurat prin site sub un jet puternic de apă de la robinet, astfel încât exemplarele tinere de râme și coconii să rămână în principal în sita superioară. Este important de remarcat faptul că întreaga suprafață a sitei superioare trebuie menținută umedă în timpul acestei operațiuni, astfel încât exemplarele tinere de râme vor pluti pe o peliculă de apă, împiedicându-le astfel să strecoare prin ochiurile sitelor. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când se utilizează un duș.

După ce întregul substrat de sol a fost strecurat prin sită, exemplarele tinere și coconii pot fi transferați prin clătire din sita superioară într-un bol. Conținutul bolului este apoi lăsat deoparte pentru a permite coconilor goi să plutească pe suprafața apei și coconilor plini și exemplarelor tinere de râme să cadă pe fundul bolului. Apa din bol poate a fi apoi scursă, iar exemplarele tinere de râme și coconii pot fi transferați într-un vas Petri conținând puțină apă. Râmele pot fi extrase pentru a fi numărate cu ajutorul unui ac sau al unei pensete.

Experiența a demonstrat că metoda (a) este mai potrivită pentru extragerea exemplarelor tinere de râme care ar putea fi strecurate cu ajutorul unei site cu ochiuri de 0,5 mm.

Eficiența metodei utilizate pentru a extrage râmele (și coconii, după caz) din substratul de sol trebuie să fie întotdeauna determinată. În cazul în care exemplarele tinere sunt colectate cu ajutorul tehnicii de sortare manuală este recomandabil ca operațiunea să se efectueze de două ori pe toate probele.

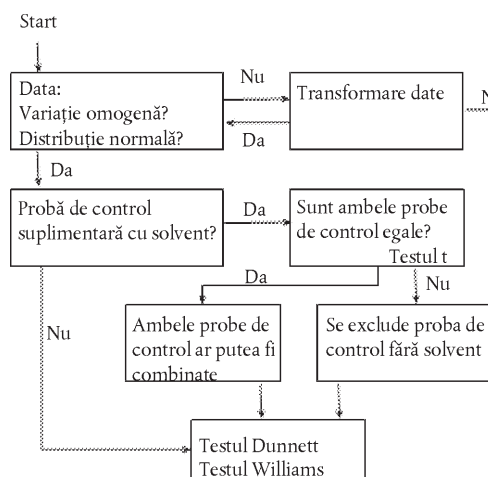
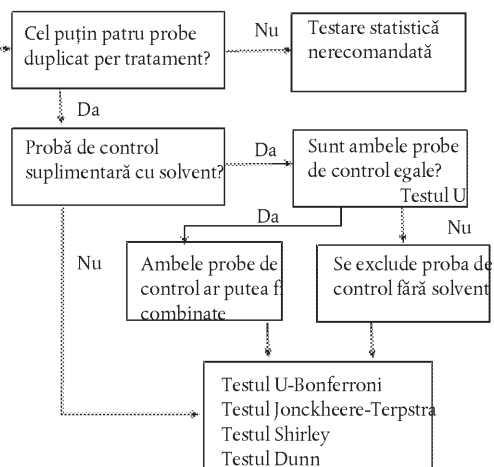
**BIBLIOGRAFIE:**

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.



▼ **M6**

## Apendicele 6

**Prezentare generală a evaluării statistice a datelor (determinarea NOEC)****Teste parametrice****Teste neparametrice**

▼ **M6****C.34. DETERMINAREA INHIBĂRII ACTIVITĂȚII BACTERIILOR ANAEROBE – REDUCEREA PRODUCȚIEI DE GAZE PROVENITE DIN NĂMOL (DE EPURARE) SUPUS PROCESULUI DE DIGESTIE ANAEROBĂ****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 224 (2007). Substanțele chimice eliminate în mediul acvatic traversează zonele aerobe și cele anaerobe, unde pot fi degradate și/sau pot inhiba activitatea bacteriană; în anumite cazuri acestea pot rămâne în zone anaerobe timp de decenii sau pentru o perioadă mai lungă fără să sufere modificări. În tratarea apelor uzate, prima etapă, decantarea primară, este aerobă în lichidul supernatant și anaerobă în nămolul subnatant. Aceasta este urmată în cea de a doua etapă de o zonă aerobă într-un bazin de aerare a nămolului activat și de o zonă anaerobă în nămolul subnatant în bazinul de decantare secundar. Nămolul rezultat din aceste două etape este supus de obicei unui tratament anaerob, producând metan și dioxid de carbon care se utilizează în mod obișnuit pentru producerea de energie electrică. Într-un mediu mai larg, substanțele chimice care ajung în sedimentele din golfuri, estuare și mare sunt susceptibile de a rămâne în aceste zone anaerobe pentru o perioadă nedeterminată dacă nu sunt biodegradabile. Proporții mai mari din anumite substanțe chimice vor ajunge în special în aceste zone din cauza proprietăților lor fizice precum solubilitatea scăzută în apă, adsorbția ridicată în solidele în suspensie, precum și imposibilitatea de a fi biodegradate aerobic.
2. Cu toate că este de preferat ca substanțele chimice eliminate în mediu să fie biodegradabile atât în condiții aerobice, cât și în condiții anaerobice, este esențial ca respectivele substanțe să nu inhibe activitatea microorganismelor în niciuna dintre zone. În Regatul Unit, au existat câteva cazuri de inhibiție completă a producției de metan cauzată, de exemplu, de pentaclorfenolul prezent în emisiile industriale, determinând costuri foarte mari de transport al nămolului inhibat de la fierbător către locurile „sigure” și de import de nămol de digestie necontaminat provenit de la instalații învecinate. Însă există numeroase cazuri de întreruperi mai puțin drastice a digestiei de multe alte substanțe chimice, inclusiv de hidrocarburi alifactice halogene (curățare chimică) și detergenți, conducând la o afectare a eficienței fierbătoarelor.
3. Doar o singură metodă, C.11 (1), abordează inhibarea activității bacteriene (Respirația de nămol activ) și evaluează efectul substanțelor chimice de testare asupra vitezei de absorbție a oxigenului în prezența unui substrat. Metoda a fost utilizată pe scară largă în vederea avertizării timpurii cu privire la posibilele efecte nocive ale substanțelor chimice asupra tratamentului aerob al apelor uzate, precum și pentru indicarea concentrațiilor neinhbitoare ale substanțelor chimice de testare care urmează să fie utilizate în diferite teste de biodegradabilitate. Metoda de testare C.43 (2) oferă o posibilitate limitată pentru determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare asupra producției de gaz prin nămol anaerob, diluat de zece ori față de concentrația sa normală de solide pentru a obține precizia necesară în evaluarea procentajului de biodegradare. Întrucât nămolul diluat ar putea fi mai sensibil la substanțe chimice inhibitoare, grupul ISO a decis să elaboreze o metodă bazată pe utilizarea de nămol nediluat. Au fost examinate cel puțin trei texte (din Danemarca, Germania și Regatul Unit) și, în cele din urmă, au fost elaborate două standarde ISO, unul bazat pe utilizarea de nămol nediluat, ISO 13 641-1 (3), și celălalt bazat pe utilizarea de nămol diluat de o sută de ori, ISO 13 641-2 (4), în scopul reprezentării mării și a sedimentelor cu populații de bacterii reduse. Ambele metode a fost supuse unui ring test (5); partea 1 a fost recunoscută ca un standard acceptabil, însă în cazul părții 2 nu s-a ajuns la un acord. Regatul Unit a considerat că, din cauză că o proporție semnificativă dintre participanți au raportat o producție de gaz foarte mică sau nulă, parțial deoarece proporția de spațiu gazos era prea mare (de 75 %) pentru o sensibilitate optimă, metoda trebuie să fie reexaminată.
4. Lucrările anterioare din Regatul Unit (6)(7) descriau o metodă manometrică bazată pe nămol de digestie nediluat la care se adaugă nămol de epurare ca substrat, în recipiente de 500 ml; aparatura era ancombrantă, iar mirosul nămolului brut era insuportabil. Ulterior, aparatura mi compactă și mai practică a Shelton și Tiedje (8), dezvoltată de Battersby și Wilson (9) a

**▼ M6**

fost aplicată cu succes de Wilson et al. (10). Kawahara et al. (11) a reușit să prepare în laborator nămol standard mai omogen pentru a fi utilizat în cadrul unor teste de biodegradabilitate anaerobă și de inhibare pe mai multe substanțe chimice. De asemenea, nămolul brut ca substrat a fost înlocuit pentru efectuarea unui test fie cu nămol anaerob diluat de o sută de ori, fie cu măr, sedimente etc. cu activitate bacteriană redusă.

5. Această metodă poate furniza informații utile pentru a prevedea eventualul efect a unei substanțe chimice de testare asupra producției de gaz în fierbătoare anaerobe. Cu toate acestea, numai testele mai lungi care simulează funcționarea mai detaliată a fierbătoarelor pot indica dacă adaptarea microorganismelor la substanța chimică de testare se poate realiza sau dacă substanțele chimice susceptibile de a fi absorbite și adsorbite în nămol se pot acumula până la atingerea unei concentrații toxice pentru o perioadă mai lungă decât cea permisă în cadrul acestui test.

**PRINCIPIUL TESTULUI**

6. Alicotele cu un amestec de nămol supus unui proces de digestie anaerobă (20 g/l-40 g/l de solide totale) și o soluție de substrat degradabil sunt incubate individual și simultan cu o serie de concentrații ale substanței chimice de testare în vase ermetice pentru o perioadă de până la trei zile. Cantitatea de gaz (metan plus dioxid de carbon) produsă este măsurată prin creșterea presiunii (Pa) în flacoane. Procentajul de inhibare a producției de gaze atribuit diferitelor concentrații ale substanței chimice de testare este calculat pe baza cantităților produse în flacoanele de testare și de probă corespunzătoare.  $EC_{50}$  și alte concentrații sunt calculate pornind de la curbele procentajului de inhibare în funcție de concentrația substanțelor chimice de testare sau, cel mai adesea, de la logaritmul său.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE**

7. Substanțele chimice de testare trebuie utilizate în mod normal în forma cea mai pură ușor accesibilă, deoarece impuritățile din anumite substanțe chimice, de exemplu clorfenolii, pot fi mult mai toxice decât substanța chimică în sine. Cu toate acestea, trebuie luată în considerare necesitatea testării substanțelor chimice în forma în care sunt produse/comercializate. Utilizarea de produse chimice preparate nu este recomandată în mod obișnuit, însă utilizarea de materiale preparate ar putea fi adecvată în cazul substanțelor chimice de testare cu solubilitate redusă. Proprietățile substanței chimice de testare care trebuie cunoscute includ solubilitatea în apă și anumiți solvenți organici, presiunea de vapori, coeficientul de absorbție, hidroliza și biodegradabilitatea în condiții anaerobe.

**APLICABILITATEA METODEI**

8. Testul se aplică substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă, inclusiv substanțelor chimice volatile. Însă, trebuie acordată o atenție sporită materialelor cu solubilitate scăzută în apă [a se vedea referința (12)] și cu volatilitate ridicată. De asemenea, pot fi utilizați inoculi proveniți din alte locuri anaerobe, de exemplu măr, soluri saturate, sedimente. Sistemele bacteriene anaerobe care au fost anterior expuse la substanțe chimice toxice pot fi adaptate astfel încât activitatea lor să fie menținută în prezența unor substanțe chimice xenobiotice. Inoculii din sistemele bacteriene adaptate pot indica o toleranță mai mare la substanțele chimice de testare comparativ cu inoculii obținuți din sisteme neadaptate.

**SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ**

9. Pentru a verifica procedura, se testează în paralel o substanță chimică de referință prin pregătirea de vase corespunzătoare ca parte a ciclurilor testului normal; 3,5 diclorfenolul s-a dovedit a fi un inhibitor consecvent al producției de gaz anaerob, precum și al consumului de oxigen de către nămolul activ și de către alte reacții biochimice. Două alte substanțe chimice s-au dovedit a fi mai inhibitoare pentru producția de metan decât 3,5 diclorfenolul, și anume bistiocianatul de metilen și pentaclorfenolul, însă rezultatele cu acestea nu au fost validate. Pentaclorfenolul nu este recomandat deoarece este dificil de obținut în formă pură.

▼ **M6****REPRODUCIBILITATEA REZULTATELOR**

10. În cadrul unui ring test internațional (5), s-a realizat doar o reproductibilitate medie a valorilor  $EC_{50}$  obținute de cele 10 laboratoare pentru 3,5 diclorfenol și acid 2-brometan sulfonic. (Intervalul pentru primul a fost cuprins între 32mg/l și 502 mg/l, iar pentru cel de al doilea între 220 și 2 190 mg/l.)

| Număr de laboratoare     | În mg/l |                  |        | În mg/g de nămol |                  |        |
|--------------------------|---------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|
|                          | medie   | abatere standard | cv (%) | medie            | abatere standard | cv (%) |
| 3,5-Diclorfenol          |         |                  |        |                  |                  |        |
| 10                       | 153     | 158              | 103    | 5                | 4,6              | 92     |
| Acid 2-brometan sulfonic |         |                  |        |                  |                  |        |
| 10                       | 1 058   | 896              | 85     | 34               | 26               | 76     |

**Date privind  $EC_{50}$  provenite din ring test – nămol nediluat**

11. Coeficienții mari de variație dintre laboratoare reflectă în mare măsură diferențele de sensibilitate a microorganismelor din nămol care au fost sau nu au fost expuse în prealabil la substanța chimică de testare sau la alte substanțe înrudite din punct de vedere chimic. Precizia determinării valorii  $EC_{50}$  pe baza concentrației nămolului a fost cu puțin mai bună decât cea a valorii „volumetrică” (mg/l). Cele trei laboratoare care au raportat precizia valorilor lor  $EC_{50}$  pentru 3,5-diclorfenol au indicat coeficienți de variație mult mai mici (22, 9 și, respectiv, 18 % pentru  $EC_{50}$  mg/g) decât cei obținuți din mediile tuturor celor zece laboratoare. Mediile individuale ale celor trei laboratoare au fost de 3,1, 3,2 și, respectiv, 2,8 mg/g. Coeficienții de variație mai mici acceptabili din cadrul laboratoarelor în comparație cu coeficienții mult mai mari dintre valorile laboratoarelor, și anume 9-22 % față de 92 %, indică faptul că există diferențe semnificative între proprietățile nămolurilor individuale.

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură**

12. Este necesară utilizarea echipamentelor obișnuite de laborator și a următoarelor:

- a) Incubator – ignifug și cu temperatură controlată de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- b) Vase de testare din sticlă rezistentă la presiune de o dimensiune nominală corespunzătoare<sup>(1)</sup>, fiecare prevăzut cu un sept impermeabil la gaze, capabil să suporte o presiune de aproximativ 2 bari sau de  $2 \times 10^5$  Pa (învelișul utilizat va fi, de exemplu, din PTFE = politetrafluoretilenă). Se recomandă utilizarea de flacoane de ser de sticlă cu un volum nominal de 125 ml și un volum real de aproximativ 160 ml, etanșate cu septuri adaptate pentru flacoanele de ser<sup>(2)</sup> și cu inele ondulate din aluminiu; însă pot fi utilizate cu succes flacoane cu un volum cuprins între 0,1 și 1 litru;

<sup>(1)</sup> Dimensiunea recomandată este cuprinsă între 0,1 litri și 1 litru.

<sup>(2)</sup> Se recomandă utilizarea de septuri din silicon impermeabile la gaze. Se recomandă, de asemenea, testarea impermeabilității la gaze a dopurilor, în special septurile din butil-cauciuc, deoarece numeroase septuri disponibile pe piață nu sunt suficient de etanșe la metan, iar anumite septuri nu rămân etanșe atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile testului.

— Se recomandă septurile impermeabile la gaze și trebuie utilizate pentru substanțe chimice volatile (anumite septuri disponibile pe piață sunt destul de subțiri, având mai puțin de 0,5 cm și nu rămân etanșe la gaze după străpungerea lor cu un ac de seringă);

— Sunt recomandate septurile din butil-cauciuc (aproximativ 1 cm), în cazul în care substanțele de testare nu sunt volatile (acestea rămân în mod normal etanșe la gaze după străpungere.)

— Înainte de începerea testului, se recomandă examinarea cu atenție a capacității septurilor de a rămâne etanșe la gaze după străpungere.

▼ **M6**c) Manometru de precizie <sup>(1)</sup> și ace fixe

Producția totală de gaze (metan și dioxid de carbon) măsurată cu ajutorul unui manometru adaptat pentru a permite măsurarea și evacuarea gazelor produse. Un exemplu de instrument adecvat este un manometru de precizie manual conectat la un ac de seringă; o supapă etanșă la gaze cu trei căi permite eliberarea presiunii în exces (anexa 1). Este necesară menținerea volumului intern în tubulatură și supapa transductorului de presiune la un nivel cât mai scăzut posibil, astfel încât erorile introduse prin neluarea în considerare a volumului echipamentului să fie nesemnificativă;

d) Recipiente etanșe pentru transportul nămolului de digestie;e) Supape de presiune cu trei căi;f) Sită, cu ochiuri de 1 mm pătrat;g) Rezervor pentru nămolul de digestie, un flacon din sticlă sau din polietilenă de înaltă densitate, cu o capacitate de 5 litri, prevăzut cu un agitator și un dispozitiv care permite trecerea unui curent de azot gazos (a se vedea punctul 13) prin spațiul superior:h) filtre membranare (0,2 μm) pentru sterilizarea substratului;i) microseringi, pentru conexiunea etanșă la gaze a transductorului de presiune [a se vedea punctul 12 litera (c)] cu spațiul superior din flacoane [a se vedea punctul 12 litera (b)]; de asemenea, pentru adăugarea de materiale de testare lichide insolubile în flacoane;j) boxă cu mănuși, opțională, dar recomandată, cu o presiune de azot ușor pozitivă.**Reactivi**

13. Se utilizează întotdeauna reactivi cu puritate analitică. Trebuie utilizat întotdeauna azot gazos de înaltă puritate cu un conținut de oxigen mai mic de 5 μl/l.

**Apă**

14. În cazul în care diluarea este necesară în orice etapă, se utilizează apă deionizată dezaerată în prealabil. Nu sunt necesare controale analitice ale acestei ape, însă trebuie asigurată întreținerea regulată a aparaturii de deionizare. Trebuie utilizată apă deionizată și pentru pregătirea soluțiilor stoc. Înainte de adăugarea inoculului la orice soluție sau soluție de diluare a materialului de testare, trebuie să se verifice ca soluția respectivă să nu conțină oxigen. Acest lucru se realizează prin suflarea de azot gazos în apa de diluție (sau în diluanți) timp de 1 oră înainte de adăugarea inoculului sau, alternativ, prin încălzirea apei de diluție până la punctul de fierbere și răcirea acesteia la temperatura camerei într-o atmosferă fără oxigen.

**Nămolul digerat**

15. Nămolul de digestie activ este prelevat într-un fierbător al unei stații de tratare a apelor uzate sau, alternativ, într-un fierbător de laborator, care tratează nămol provenit în cea mai mare parte din apele uzate menajere. Informații practice privind nămolul dintr-un fierbător de laborator sunt disponibile în alte referințe (11). În cazul în care este prevăzută utilizarea unui inocul adaptat, poate fi luată în considerare prelevarea de nămol de digestie provenit de la o stație de tratare a efluenților industriali. Pentru

<sup>(1)</sup> Manometrul trebuie utilizat și calibrat la intervale regulate, conform instrucțiunilor producătorului. În cazul în care este utilizat un manometru având calitatea necesară, de exemplu capsulat cu o membrană din oțel, nu este necesară nicio calibrare în laborator. Acesta trebuie calibrat de un institut autorizat la intervalele recomandate. Exactitatea calibrării poate fi verificată în laborator cu o măsurătoare într-un singur punct la  $1 \times 10^5$  Pa pe un manometru cu afișare mecanică. Atunci când acest punct este măsurat corect, liniaritatea va fi, de asemenea, nealterată. În cazul utilizării altor dispozitive de măsurare (fără calibrare certificată de către producător), se recomandă conversia pe intervalul total la intervale regulate (pendicele 2).

**▼ M6**

colectarea nămolului, a se utiliza flacoane cu gura largă din polietilenă de înaltă densitate sau dintr-un material similar, care se pot dilata. Se introduce nămol în flacoanele de probe până la aproximativ 1 cm distanță de gura acestora, se închid ermetic, de preferat cu o supapă de siguranță [punctul 12 litera (e)] și se așează în recipiente etanșe [punctul 12 litera (d)] pentru a reduce la minimum șocul termic, până la transferul acestora într-un incubator menținut la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La deschiderea flacoanelor, se eliberează presiunea de gaze în exces prin desfacerea cu atenție a capacului sau cu ajutorul unei supape de presiune cu trei căi [punctul 12 litera (e)]. Se recomandă utilizarea nămolului într-un interval de câteva ore de la prelevare sau depozitarea acestuia la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  sub un spațiu superior umplut cu azot timp de maximum 3 zile, când survine în mod obișnuit o oarecare pierdere de activitate.

**Avertisment** – Nămolul de digestie produce gaze inflamabile care prezintă risc de incendiu și de explozie: acesta conține și organisme potențial patogene, de aceea, trebuie luate măsuri de precauție corespunzătoare în momentul manipulării acestuia. Din motive de siguranță, a se evita utilizarea de vase din sticlă pentru colectarea nămolului.

**Inocul**

16. Imediat înainte de utilizare, se amestecă nămolul prin agitare ușoară și se strecoară cu o strecurătoare cu ochiuri de  $1\text{ mm}^2$  [a se vedea punctul 12 litera (f)] înainte de a se introduce într-un flacon corespunzător [punctul 12 litera (g)] al cărui spațiu superior este traversat de un curent de azot. Se prelevează o probă pentru măsurarea concentrației materiilor solide uscate totale [a se vedea, de exemplu, ISO 11 923 (13) sau un standard UE echivalent]. A se utiliza în general nămol fără diluție. Concentrația solidelor este de obicei cuprinsă între 2 % și 4 % (g/v). Trebuie verificată valoarea pH-ului nămolului și, dacă este necesar, ajustată la  $7 \pm 0,5$ .

**Substratul de testare**

17. Se dizolvă 10 g de bulion nutritiv (de exemplu oxid), 10 g de extract de drojdie și 10 g de D-glucoză în apa deionizată și se diluează la 100 ml. Se sterilizează prin filtrare cu un filtru membranar de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  [punctul 12 litera (h)] și se utilizează imediat sau se depozitează la o temperatură de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  maximum 1 zi.

**Substanța chimică de testare**

18. Se pregătește o soluție stoc separată pentru fiecare substanță chimică de testare solubilă în apă astfel încât să conțină, de exemplu, 10 g/l din substanța chimică în apa de diluție fără oxigen (punctul 14). Se utilizează volume corespunzătoare din aceste soluții stoc pentru a pregăti amestecurile de reacție cu concentrații crescătoare. Alternativ, se pregătește o serie de soluții de diluare din fiecare soluție stoc astfel încât volumul adăugat la flacoanele de testare să fie identic cu cel pentru fiecare concentrație finală necesară. Dacă este necesar, pH-ul soluțiilor stoc trebuie ajustat la  $7 \pm 0,2$ .
19. Pentru substanțele chimice care nu sunt suficient de solubile în apă, a se consulta standardul ISO 10 634 (12) sau un standard UE echivalent. În cazul în care trebuie utilizat un solvent organic, a se evita solvenți precum cloroformul și tetraclorura de carbon cunoscute ca fiind inhibitoare puternice ale producției de metan. Se prepară o soluție cu o concentrație corespunzătoare de substanță chimică insolubilă în apă într-un solvent volatil adecvat, de exemplu, acetonă, eter dietilic. Se adaugă volumele necesare de soluție de solvent în flacoanele de testare goale [punctul 12 litera (b)] și se evaporă solventul înainte de adăugarea nămolului. Pentru alte tratamente, ase consulta standardul ISO 10 634 (12) sau un standard UE echivalent, însă a se avea în vedere faptul că orice agent tensioactiv utilizat pentru producere de emulsii poate fi inhibitor pentru producția anaerobă de gaze. Dacă se estimează că prezența unor solvenți organici și a unor emulsionanți cauzează artefacte, substanța chimică de testare ar putea fi adăugată direct la amestecul de testare sub formă de pudră sau sub formă lichidă. Substanțele chimice volatile și substanțele chimice de testare lichide insolubile în apă pot fi injectate în flacoane de ser inoculat cu ajutorul unor microseringi [punctul 12 litera (i)].

▼ **M6**

20. Se adaugă substanțele chimice de testare în flacoane pentru a obține o serie geometrică de concentrații, de exemplu, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l și 15,6 mg/l. În cazul în care nu se cunoaște intervalul de toxicitate din soluții chimice similare, se efectuează mai întâi un test preliminar de stabilire a intervalului la concentrațiile de 1 000 mg/l, 100 mg/l și 10 mg/l pentru determinarea intervalului corespunzător.

**Substanța chimică de referință**

21. Se prepară o soluție apoasă de 3,5-diclorfenol (10 g/l) adăugând treptat cantitatea minimă de 5 mol/l de soluție de hidroxid de sodiu la materia solidă, agitând în același timp până la dizolvare. Se adaugă apoi apă de diluție deoxigenată (punctul 14) la volumul necesar; sonicarea poate favoriza diluarea. Pot fi utilizate și alte substanțe chimice de referință atunci când intervalul mediu al  $EC_{50}$  a fost obținut în cadrul a cel puțin trei teste cu inoculi diferiți (surse diferite sau momente diferite de colectare).

**INTERFERENȚĂ/ERORI**

22. Se pare că anumiți constituenți ai nămolului ar putea reacționa cu potențiali inhibitori anulându-le efectele asupra microorganismelor determinând o inhibare mai redusă sau nulă. De asemenea, dacă nămolul conține deja o substanță chimică inhibitoare, ar putea fi obținute rezultate eronate atunci când substanța chimică respectivă este supusă testării. În afară de aceste posibilități, există o serie de factori identificați care pot conduce la rezultate false. Aceștia sunt enumerați în apendicele 3 împreună cu metodele pentru eliminarea sau cel puțin pentru reducerea erorilor.

**PROCEDURA DE TESTARE**

23. Numărul probelor duplicate necesare depinde de gradul de precizie necesar pentru indicii de inhibare. În cazul în care capacele flacoanelor sunt suficient de etanșe la gaze pe întreaga durată a testului, se pregătește un singur lot (cel puțin trei probe duplicate) de flacoane de testare la fiecare concentrație necesară. Similar, se pregătește un lot de flacoane cu substanța chimică de referință și un set de probe de control. Cu toate acestea, în cazul în care fiabilitatea capacelor flacoanelor este asigurată doar pentru o străpungere sau pentru câteva străpungeri, se pregătește un lot (de exemplu, trei probe duplicate) de flacoane de testare pentru fiecare interval (t) pentru care sunt necesare rezultate la toate concentrațiile unei substanțe chimice de testare care trebuie testate. Similar, se pregătesc loturi „t” de flacoane pentru substanța chimică de referință și pentru probele de control.
24. Se recomandă utilizarea unei boxe cu mănuși [punctul 12 litera (j)]. Cu cel puțin 30 de minute înainte de începerea testului, se lasă să treacă un flux de azot gazos prin boxa cu mănuși care conține toate echipamentele necesare. Temperatura nămolului trebuie să fie de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pe parcursul manipulării și ermetizării flacoanelor.

**Test preliminar**

25. În cazul în care nu se cunoaște activitatea nămolului, se recomandă efectuarea unui test preliminar. Se pregătesc probe de control pentru a obține, de exemplu, concentrații ale materiilor solide de 10 g/l, 20 g/l și 40 g/l la care se adaugă substratul, însă nu se utilizează nicio substanță chimică de testare. De asemenea, se utilizează volume diferite de amestec de reacție pentru a obține trei sau patru raporturi între volumul de spațiu superior și volumul de lichid. Dintre rezultatele de volume de gaze produse la diferite intervale de timp, se aleg condițiile cele mai adecvate care permit două măsurători zilnice caracterizate de volume semnificative de gaze și care eliberează o presiune zilnică cu o sensibilitate <sup>(1)</sup> optimă fără risc de explozii.

**Adăugarea substanțelor chimice de testare**

26. În flacoanele de testare goale se adaugă substanțe chimice de testare solubile în apă [punctul 12 litera (b)] sub formă de soluții apoase (punctul 18). Se

<sup>(1)</sup> Aceasta se aplică modelului experimental și condițiilor experimentale în care volumele de gaze produse – din probele-martor și din vase care indică o inhibare de 70 – 80 % – pot fi estimate cu marje de eroare acceptabile.

## ▼ M6

utilizează seturi de flacoane care conțin cel puțin trei probe duplicate pentru fiecare concentrație dintr-un interval (punctul 20). În cazul unor substanțe chimice de testare insolubile sau puțin solubile, se injectează soluții din acestea în solvenți organici cu ajutorul unei microseringi în flacoanele goale pentru a obține seturi de probe duplicate cu cinci concentrații de substanță chimică de testare. Se evaporă solvențul prin purjare cu un jet de azot gazos pe suprafața soluțiilor din flacoanele de testare. Alternativ, se adaugă direct în flacoanele de testare cantități cântărite de substanțe chimice solide insolubile.

27. Dacă substanțele chimice de testare lichide insolubile sau puțin solubile în apă nu se adaugă utilizând un solvent, acestea se adaugă direct cu ajutorul unei microseringi în flacoanele de testare după adăugarea inoculului și a substratului de testare (a se vedea punctul 30). Substanțele chimice de testare volatile pot fi adăugate în același mod.

#### Adăugarea inoculului și a substratului

28. Se agită un volum corespunzător de nămol de digestie strecurat (a se vedea punctul 16) într-un flacon de 5 litri [punctul 12 litera (g)], lăsând în același timp să treacă prin spațiul superior un curent de azot gazos. Flacoanele de testare, care conțin soluțiile apoase sau soluțiile dintr-un solvent evaporat de substanțe chimice de testare, sunt purjate cu un curent de azot gazos timp de aproximativ două minute pentru a elimina aerul. Se repartizează în flacoanele de testare alicote, de exemplu 100 ml, de nămol amestecat bine utilizând o pipetă cu vârf larg sau o eprubetă gradată. Este esențial ca pipeta să fie umplută dintr-o singură încercare cu volumul exact de nămol deoarece materiile solide din nămol se sedimentează cu ușurință. În cazul în care se prelevează prea mult, pipeta se golește și se repetă operațiunea.
29. Se adaugă apoi o cantitate suficientă de soluție de substrat (punctul 17) pentru a obține în amestec o concentrație de 2 g/l din fiecare dintre componentele bulionului nutritiv, și anume extractul de drojdie și D-glucoza, continuând în același timp purjarea cu azot. În continuare este prezentat un exemplu de loturi de testare.

| Concentrația masică finală a substanței chimice de testare din flacoanele de testare (mg/l) | Volumul substanței chimice de testare (ml) |                                  | Reactivi și medii (ml)    |                   |                     |
|---|--|----------------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|
|   | Soluție stoc a) 10 g/l punctul 18          | Soluție stoc b) 1 g/l punctul 18 | Apa de diluție punctul 14 | Inocul punctul 16 | Substrat punctul 17 |
| 0   | —  | 0                                | 1,0                       | 100               | 2                   |
| 1   | —  | 0,1                              | 0,9                       | 100               | 2                   |
| 3,3   | —  | 0,33                             | 0,67                      | 100               | 2                   |
| 10  | 0,1  | —                                | 0,9                       | 100               | 2                   |
| 33  | 0,33                                       | —                                | 0,67                      | 100               | 2                   |
| 100   | 1,0  | —                                | 0                         | 100               | 2                   |

Volumul total al flaconului = 160 ml. Volumul de lichid = 103 ml

Volumul de gaz = 57 ml sau 35,6 % din volumul total.

30. În mod similar, se purjează cu azot gazos un număr suficient de flacoane de testare goale pentru a elimina orice substanță chimică de testare volatilă și lichidă insolubilă (a se vedea punctul 27).



▼ **M6****Probele de control și substanța chimică de referință**

31. Se prepară seturi de flacoane conținând cel puțin trei probe duplicat, incluzând doar nămolul și substratul, pentru a fi utilizate ca probe de control. Se prepară apoi flacoane duplicat care conțin nămolul și substratul, precum și o cantitate suficientă de soluție stoc a substanței chimice de referință, 3,5-diclorfenol (punctul 21) pentru a obține o concentrație finală de 150 mg/l. Această concentrație trebuie să inhibe producția de gaze cu aproximativ 50 %. Alternativ, se prepară un interval de concentrații pentru substanța chimică de referință. În plus, se pregătesc patru flacoane suplimentare pentru măsurarea pH-ului care conțin nămol, apă deoxigenată și substrat. Se adaugă substanța de testare în două flacoane cu cea mai mare concentrație de testare, iar apa deoxigenată se adaugă în cele două flacoane rămase.
32. Toate flacoanele – substanțele chimice de testare și de referință și probele de control – trebuie să conțină același volum ( $V_R$ ) de lichid; dacă este necesar, se adaugă apă deionizată deoxigenată (punctul 14) pentru a ajusta volumul. Spațiul superior trebuie să fie între 10 % și 40 % din volumul flacoanelor, valoarea efectivă fiind selectată din datele obținute în urma testului preliminar. După adăugarea tuturor constituenților în flacoane, se îndepărtează acul de alimentare cu gaz și se etanșează fiecare flacon cu un dop din cauciuc și cu o capsulă din aluminiu [punctul 12 litera (b)] umezind dopul cu o picătură de apă deionizată pentru a facilita introducerea sa. Se amestecă conținutul fiecărui flacon prin agitare.

**Incubarea flacoanelor**

33. Flacoanele sunt transferate în incubatorul controlat termostatic, de preferință echipat cu un dispozitiv de agitare, și ținute la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Flacoanele sunt incubate la întuneric. După aproximativ 1 oră, se echilibrează presiunea în flacoane la presiunea atmosferică prin introducerea acului seringii, atașat la manometru [punctul 12 litera (c)], în capacul fiecărui flacon, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și, în final, se închide supapa. Acul trebuie introdus la un unghi de  $45^{\circ}$  pentru a împiedica scurgerile de gaze din flacoane. Dacă flacoanele sunt incubate fără un dispozitiv de agitare, acestea trebuie agitate manual de două ori pe zi pe parcursul întregii perioade de incubare pentru a echilibra sistemul. Flacoanele trebuie incubate în poziție răsturnată pentru a împiedica orice pierdere de gaze prin sept. Cu toate acestea, răsturnarea nu este recomandată în cazurile în care substanțele chimice de testare insolubile se pot lipi de fundul flaconului.

**Măsurarea presiunii**

34. Atunci când flacoanele au atins temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se măsoară și se înregistrează pH-ul conținutului a patru flacoane pregătite în acest scop și se elimină conținutul; se continuă incubarea la întuneric a restului de flacoane. Se măsoară și se înregistrează presiunea din flacoane de două ori pe zi timp de 48-72 de ore prin introducerea acului manometrului, pe rând, în capacul fiecărui flacon, uscând acul după fiecare măsurătoare. Toate părțile flaconului trebuie menținute la temperatura de incubare pe parcursul măsurătorii care trebuie efectuată cât mai repede posibil. Presiunea se înregistrează după stabilizarea afișajului acesteia. Apoi se deschide supapa pentru ventilație și se închide atunci când presiunea atinge valoarea zero. Testul durează de obicei 48 de ore din momentul primei echilibrări a presiunii, indicate prin „timpul 0”. Numărul măsurătorilor și a ventilărilor trebuie limitat în cazul substanțelor chimice volatile la unu (la încheierea perioadei de incubare) sau la doi pentru a reduce la minimum pierderile de substanță chimică de testare (10).
35. Dacă rezultatul măsurătorii presiunii este negativ, nu deschideți supapa. Uneori se acumulează umezeală în acul și tubul seringii, fenomen indicat printr-o valoare ușor negativă a presiunii. În acest caz, se îndepărtează acul, se agită tubul, se șterge cu un șervețel și se introduce un ac nou.

**Măsurarea pH-ului**

36. pH-ul conținutului fiecărui flacon se măsoară și se înregistrează după măsurarea presiunii finale.

**▼ M6****DATE ȘI RAPORT****Exprimarea rezultatelor**

37. Se calculează suma și media presiunilor înregistrate la fiecare interval de timp pentru fiecare set de flacoane duplicat și se calculează media presiunilor brute cumulate de gaze la fiecare interval de timp pentru fiecare set de flacoane duplicat. Se trasează curbele producției medii cumulate de gaze (Pa) în funcție de timp pentru flacoanele de control, de testare și de referință. Se selectează un timp pe partea liniară a curbei, în general 48 de ore, și se calculează procentajul de inhibare (I) pentru fiecare concentrație cu ecuația [1]:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1],$$

unde

I = procentajul de inhibiție, în %;

P<sub>t</sub> = presiunea gazului produsă cu materialul de testare la timpul selectat, în Pascal (Pa);

P<sub>c</sub> = presiunea gazului produsă în proba de control la același timp, în Pascal (Pa).

Se recomandă trasarea a două curbe, și anume curba I în funcție de concentrație și, de asemenea, în funcție de logaritmul concentrației astfel încât să poată fi selectată curba care este cea mai apropiată de liniaritate. Se evaluează vizual sau prin analiză de regresie valoarea EC<sub>50</sub> (mg/l) pornind de la curba cea mai apropiată de liniaritate. În scopul comparării, ar putea fi mai utilă exprimarea concentrației substanței chimice în mg de substanță chimică/g din totalul materiilor solide uscate. Pentru a obține această concentrație, se împarte concentrația volumetrică (mg/l) la concentrația volumetrică a materiilor solide din nămolul uscat (g/l) (punctul 16).

38. Se calculează procentajul de inhibare obținut prin unica concentrație a substanței chimice de referință utilizată sau valoarea EC<sub>50</sub> în cazul în care a fost examinat un număr suficient de concentrații.
39. Se realizează conversia presiunii medii a gazelor produse în flaconul de control P<sub>c</sub>(Pa) în volum pe baza curbei de calibrare a manometrului (apendicele 2) și se calculează astfel randamentul de gaze, exprimat în volumul produs în 48 de ore din 100 ml de nămol nediluat la o concentrație a materiilor solide cuprinsă între 2 % (20 g/l) și 4 % (40 g/l).

**Criterii de validitate**

40. Rezultatele obținute în urma testului interlaboratoare ISO (5) au indicat că substanța chimică de referință (3,5-diclorfenol) a cauzat o inhibare de 50 % a producției de gaze într-un interval al concentrațiilor cuprins între 32 mg/l și 510 mg/l, cu o medie de 153 mg/l (punctul 10). Acest interval este atât de larg încât nu pot fi stabilite cu încredere limite exacte pentru inhibiție utilizabile drept criterii de validitate; acest lucru ar trebui să fie posibil atunci când tehnicile vor indica un mod de producere de inocul mai consistent. Volumele de gaze produse în flacoanele de control în 48 de ore s-au încadrat între 21 ml/g de materie uscată de nămol și 149 ml/g (cu o medie de 72 ml/g). Nu a existat un raport clar între volumul de gaze produs și valoarea EC<sub>50</sub> corespunzătoare. pH-ul final a variat între 6,1 și 7,5.
41. Testul este considerat valid atunci când este obținută o inhibare mai mare de 20 % în proba de control de referință care conține 150 mg/l de 3,5-diclorfenol, atunci când se produce mai mult de 50 ml de gaz per g de materie uscată în proba-martor și valoarea pH-ului se încadrează în intervalul 6,2-7,5 la finalul testului.

**Raportul de testare**

42. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța chimică testată*

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală și proprietățile fizico-chimice relevante;

**▼ M6**

- puritatea (impuritățile) substanței chimice testate.

*Condițiile de testare*

- volumul conținutului de lichid și volumul spațiului superior din vasele de testare;
- descrierea vaselor de testare și a aparatului de măsurare a gazelor (de exemplu, tipul de manometru);
- aplicarea substanței chimice de testare și a substanței chimice de referință la sistemul de testare, concentrațiile de testare utilizate și utilizarea de solvenți;
- detalii privind inoculul utilizat: numele stației de tratare a apelor uzate, descrierea sursei apelor uzate tratate (de exemplu, temperatura de funcționare, timpul de retenție al nămolului, provenit în cea mai mare parte din apele uzate menajere sau deșeuri industriale etc.), concentrația materiilor solide, activitatea de producere de gaze a fierbătorului anaerob, expunerea prealabilă sau posibilă preadaptare la substanțele chimice toxice sau locul prelevării mărului, sedimentului etc.;
- temperatura și intervalul de incubare;
- numărul de flacoane duplicat.

*Rezultate*

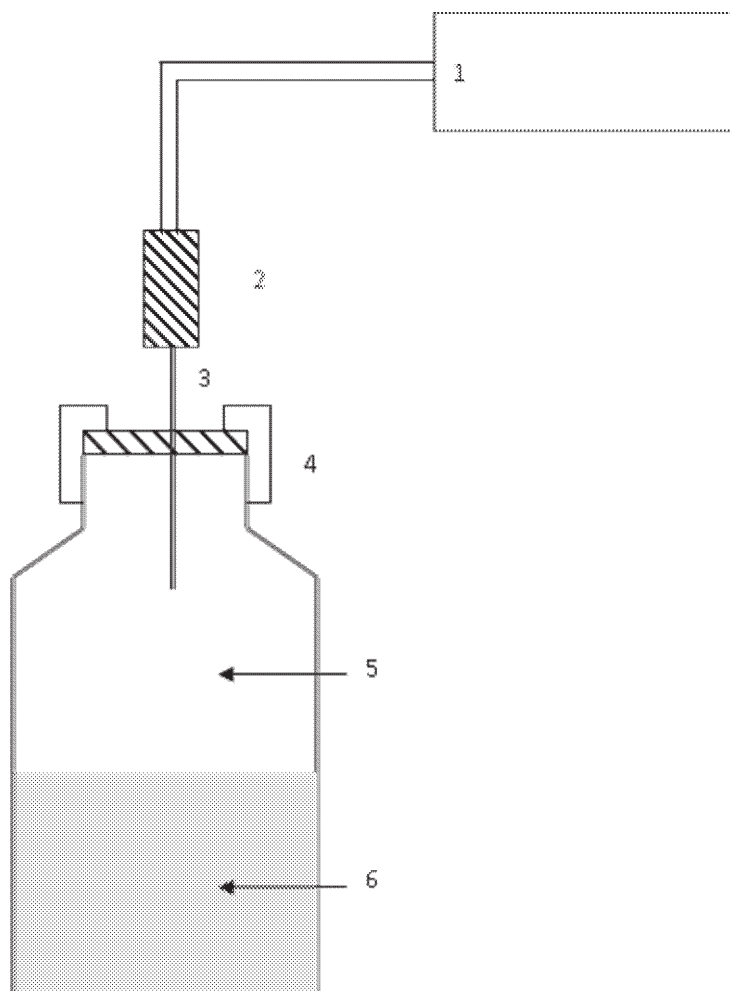
- valoarea pH-ului la finalul testului;
- toate datele măsurate colectate din vasele de testare, probele-martor și vasele de control cu substanțele chimice de referință, după caz (de exemplu, presiunea în Pa sau milibari) sub formă de tabel;
- procentul de inhibare din flacoanele de testare și de referință și curbele de inhibare în funcție de concentrație;
- calcularea valorilor EC<sub>50</sub>, exprimate în mg/l și mg/g;
- producția de gaze per g de nămol în 48 de ore;
- motivele unei eventuale respingeri a rezultatelor testului;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice abatere de la procedurile din cadrul prezentei metode de testare și discutarea tuturor abaterilor observate în rezultatele testului cauzate de interferențe și de erori în raport cu rezultatele estimate;
- abordarea, de asemenea, a aspectelor legate de definirea scopului testului, și anume măsurarea toxicității pentru microorganisme expuse sau nu în prealabil.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Capitolul C.11 din prezenta anexă: Nămol activ, test de inhibare a respirației.
- (2) Capitolul C.43 din prezenta anexă: Biodegradabilitatea anaerobă a substanțelor organice din nămolul digerat: metoda prin măsurarea producerii de gaze.
- (3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.
- (4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

**▼ M6**

- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Res. Control Fed. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential., *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS și Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA și Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Ind. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T și Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
- (12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 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.
- (13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6***Apendicele 1***Exemplu de aparat pentru măsurarea producției de biogaz prin presiunea gazului***Legendă:*

- 1 – Manometru
- 2 – Supapă etanșă la gaze cu trei căi
- 3 – Ac de seringă
- 4 – Capac etanș la gaze (capsulă și sept ondulate)
- 5 – Spațiu superior
- 6 – Inocul de nămol digerat

Vase de testare dintr-un mediu cu o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

**▼ M6***Apendicele 2***Conversia măsurătorilor manometrice**

Valorile indicate de manometru pot fi raportate la volumele de gaze cu ajutorul unei curbe standard de referință și pornind de la aceasta se poate calcula volumul de gaz produs per g de nămol uscat per 48 de ore. Acest index de activitate este utilizat ca unul dintre criteriile de evaluare a validității rezultatelor testului. Curba de calibrare se obține prin injectarea volumelor de gaz cunoscute la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în flacoanele de ser care conțin un volum de apă egal cu cel al amestecului de reacție,  $V_R$ ;

- Se introduc alicote de  $V_R$  ml de apă, menținute la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în cinci flacoane de ser. Se etanșează flacoanele și se așează într-o baie de apă la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  timp de 1 oră pentru echilibrare;
- Se pornește manometrul, se lasă să se stabilizeze și se reglează la zero;
- Se introduce acul seringii prin capacul unuia dintre flacoane, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și se închide supapa;
- Se repetă procedura cu restul flacoanelor;
- Se injectează 1 ml de aer la temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în fiecare flacon. Se introduce acul (pe manometru) prin capacul unuia dintre flacoane și se așteaptă stabilizarea presiunii. Se înregistrează presiunea, se deschide supapa până ce presiunea atinge valoarea zero și apoi se închide supapa;
- Se repetă procedura cu restul flacoanelor;
- Se repetă întreaga procedură utilizând 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml și 50 ml de aer;
- Se trasează o curbă de conversie a presiunii (Pa) în funcție de volumul de gaz injectat (ml). Răspunsul instrumentului este linear în intervalul 0 Pa-70 000 Pa și 0 ml-50 ml de producție de gaze.

▼ **M6***Apendicele 3***Factori identificați care pot conduce la rezultate false****(a) Calitatea dopurilor flacoanelor**

Sunt disponibile pe piață diferite tipuri de septuri pentru flacoanele de ser; multe dintre acestea, inclusiv butil-cauciucul, pierd din etanșeitate atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile acestui test. Uneori presiunea scade foarte ușor după străpungerea septului cu acul seringii. Se recomandă utilizarea unor septuri etanșe la gaze pentru a preveni scurgerile [punctul 12 litera (b)].

**(b) Umiditatea din acul seringii**

Uneori se acumulează umezeală în acul și tubul seringii, fenomen indicat printr-o valoare ușor negativă a presiunii. Pentru a corecta acest fenomen, se îndepărtează acul, se agită tubul, se șterge cu un șervețel și se introduce un ac nou [punctele 12 litera (c) și 35].

**(c) Contaminarea cu oxigen**

Metodele anaerobe sunt sensibile la erori determinate de contaminarea cu oxigen care poate cauza reducerea producției de gaze. În cadrul prezentei metode, această posibilitate ar trebui redusă la minimum prin utilizarea de tehnici strict anaerobe, inclusiv utilizarea unei boxe cu mănuși.

**(d) Substraturile brute din nămol**

Producția anaerobă de gaze și sensibilitatea nămolului sunt influențate de substraturile care sunt transferate cu inoculul în flacoanele de testare. Nămolul digerat din fierbătoare anaerobe menajere conține adesea materii identificabile ca păr și reziduuri vegetale de celuloză, care tind să îngreuneze prelevarea de probe reprezentative. Prin strecurare, materiile insolubile grosiere de nămol pot fi eliminate pentru a spori reprezentativitatea prelevării de probe (punctul 16).

**(e) Substanțele chimice de testare volatile**

Substanțele de testare volatile vor fi eliberate în spațiul superior al flacoanelor de testare. Acest lucru poate avea ca rezultat pierderea din sistem a unei părți din materialele de testare pe parcursul ventilării după efectuarea măsurătorilor presiunii, ceea ce se traduce prin valori ale  $EC_{50}$  fals ridicate. Acest tip de erori poate fi redus prin alegerea corectă a unui raport între volumul de spațiu superior și volumul de lichid și prin eliminarea ventilării după efectuarea măsurătorilor presiunii (10).

**(f) Neliniaritatea producției de gaze**

În cazul în care curba de producție medie cumulată de gaze în raport cu timpul de incubare nu este aproape liniară pentru o perioadă de 48 de ore, exactitatea testului poate fi diminuată. Pentru soluționarea acestei probleme, se recomandă utilizarea de nămol de digerare dintr-o sursă diferită și/sau adăugarea unei concentrații crescute de substrat de testare și bulion nutritiv, extract de drojdie și glucoză (punctul 29).

▼ **M6***Apendicele 4***Aplicare pe probe prelevate din mediu cu concentrație de biomasă redusă – mъл, sedimente etc.****INTRODUCERE**

- A.1 În general, activitatea microbiană specifică (volumul de gaze produs per g de materii solide uscate) a mълurilor, sedimentelor, solurilor etc. anaerobe naturale este mult mai redusă decât cea a nămолului anaerob derivat din apele uzate. În consecință, atunci când urmează să fie măsurate efectele inhibitorii ale substanțelor chimice asupra acestor probe mai puțin active, trebuie modificate unele dintre condițiile experimentale. Pentru aceste probe mai puțin active, există două căi generale de acțiune posibile:
- (a) Efectuarea unui test preliminar modificat (punctul 25) cu proba de nămол, de sol etc. nediluat la o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  sau la temperatura din locul de prelevare a probei, pentru optimizarea simulării (conform părții 1 din ISO 13 641);
  - (b) Sau efectuarea testului cu un nămол diluat provenit de la un fierbător (1 în 100) pentru a simula activitatea redusă prevăzută a probei prelevate din mediu, însă menținând temperatura la  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (conform părții 2 din ISO 13 641).
- A.2 Opțiunea (a) se poate realiza urmând metoda descrisă în prezenta anexă (echivalentă cu partea 1 din ISO 13 641), însă este esențială efectuarea unui test preliminar (punctul 25) pentru determinarea condițiilor optime, cu excepția cazului în care acestea sunt deja cunoscute din teste anterioare. Proba de mъл sau de sediment trebuie să fie bine amestecată, de exemplu, într-un blender și, dacă este necesar, diluată cu o proporție mică de apă de diluție dezaerată (punctul 14) astfel încât să fie suficient de mobilă pentru a fi transferată cu o pipetă cu vârful larg sau cu o eprubetă gradată. Dacă se consideră că lipsesc nutrienți, proba de mъл poate fi centrifugată (în condiții anaerobe) și repusă în suspensie în mediul mineral care conține extract de drojdie (A.11).
- A.3 Opțiunea (b). Aceasta reproduce în mod rezonabil activitatea redusă a probelor prelevate din mediu, cu excepția concentrației ridicate de materii solide în suspensie prezentă în aceste probe. Nu se cunoaște rolul acestor materii solide în inhibare, însă este posibil ca reacția dintre substanțele chimice de testare și constituenții mълului, precum și adsorbția substanțelor chimice de testare în materiile solide să aibă ca rezultat o scădere a toxicității substanței chimice de testare.
- A.4 Temperatura este un alt factor important: pentru o simulare riguroasă, testele trebuie efectuate la temperatura din locul prelevării probelor, întrucât se știe că diferite grupuri metanogene de bacterii sunt funcționale în intervale de temperatură diferite, și anume termofilele ( $\sim 30\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mezofilele ( $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) și psihrofilele ( $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), care pot prezenta modele de inhibare diferite.
- A.5 Durata. În cadrul testului general, partea 1, în care s-a utilizat nămол nediluat, producția de gaze în cele 2-4 zile a fost întotdeauna suficientă, în timp ce în partea 2, cu nămол diluat de 100 de ori, producția de gaze, în cazul în care a existat, a fost insuficientă pe parcursul acestei perioade în cadrul ring testului. Madsen et al (1996), în descrierea lor a acestui din urmă test, propun o perioadă de 7 zile.

**Testare cu o concentrație redusă de biomasă (opțiunea b)**

Trebuie efectuate următoarele modificări și completări, prin adăugarea sau înlocuirea anumitor puncte și subpuncte din textul principal.



▼ **M6**

A.6 La punctul 6 se adaugă textul următor: Principiul testului;

„Prezenta tehnică poate fi utilizată cu nămol anaerob diluat 1 la 100, parțial pentru a simula activitatea redusă a mărului și a sedimentelor. Temperatura de incubare poate fi de 35 °C sau egală cu cea din locul în care a fost prelevată proba. Întrucât activitatea bacteriană este mult mai redusă decât în nămolul nediluat, perioada de incubare trebuie prelungită la cel puțin 7 zile”.

A.7 La punctul 12 litera (a) se adaugă textul următor:

„incubatorul trebuie să aibă capacitatea de a funcționa la temperaturi mai mici de 15 °C.”

A.8 Se adaugă un reactiv suplimentar după punctul 13:

„Acid fosforic ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 85 % procente masice în apă.”

A.9 La finalul punctului 16 se adaugă următorul text:

„Se utilizează în cadrul testului o concentrație finală de  $0,20 \pm 0,05$  g/l din materiile solide uscate.”

A.10 Punctul 17. Substratul de testare

Acest substrat nu este utilizat, însă este înlocuit cu extract de drojdie (a se vedea punctul 17; punctele A.11, A.12, A.13).

A.11 Este necesar un mediu mineral, incluzând oligoelemente, pentru diluarea nămolului anaerob și se recomandă adăugarea la acest mediu a substratului organic, extractul de drojdie.

După alineatul (17), se adaugă

„(a) Mediu mineral de testare, cu extract de drojdie.

Acesta se prepară dintr-un mediu de testare concentrat de 10 ori [punctul 17 litera (b), A.12] cu o soluție cu oligoelemente [punctul 17 litera (c), A.13]. Se utilizează sulfură de sodiu nonahidrat proaspătă [punctul 17 litera (b)]; A.12] sau se spală și se usucă înainte de utilizare pentru a se asigura că are o capacitate reductoare suficientă. În cazul în care testul este efectuat fără a se utiliza o boxă cu mânuși [punctul 12 litera (j)], concentrația sulfurii de sodiu în soluția stoc trebuie să fie crescută la 2 g/l (de la 1 g/l). Sulfura de sodiu poate fi adăugată și dintr-o soluție stoc corespunzătoare prin septul flacoanelor de testare închise, întrucât această procedură va reduce riscul de oxidare, până la obținerea unei concentrații finale de 0,2 g/l. Alternativ, poate fi utilizat citrat de titan (III) [punctul 17 litera (b)]. Acesta se adaugă prin septul flacoanelor de testare închise pentru a obține o concentrație cuprinsă între 0,8 mmol/l și 1,0 mmol/l. Citratul de titan (III) este un agent reductoare foarte eficient și cu toxicitate redusă, care se prepară după cum urmează: se dizolvă 2,94 g de citrat trisodic dihidrat în 50 ml de apă de diluție fără oxigen (punctul 14) (rezultând o soluție de 200 mmol/l) și se adaugă 5 ml de soluție de clorură de titan (III) (15g/100 ml de apă de diluție). Se neutralizează la un pH de  $7 \pm 0,5$  cu carbonat de sodiu și se distribuie într-un flacon de ser corespunzător sub un curent de azot gazos. Concentrația de citrat de titan (III) din această soluție stoc este de 164 mmol/l. Utilizați mediul de testare imediat sau depozitați-l la 4 °C timp de maximum 1 zi.

A.12 (b) Mediul de testare concentrat de zece ori, pregătit cu următoarele componente:

|   |       |
|---|-------|
| dihidrogenofosfat de potasiu anhidru ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) | 2,7 g |
| hidrogenofosfat disodic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )             | 4,4 g |
| (sau 11,2 g dodecahidrat)   | 5,3 g |
| clorură de amoniu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )                      |       |

▼ **M6**

|   |                        |
|---|------------------------|
| clorură de calciu dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )          | 0,75 g                 |
| clorură de magneziu hexahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )      | 1,0 g                  |
| clorură de fier (II) tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )    | 0,2 g                  |
| resazurin (indicator redox)   | 0,01 g                 |
| sulfură de sodiu nonahidratat ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) | 1,0 g                  |
| [sau citrat de titan (III)] concentrație finală                                   | 0,8 mmol/l -1,0 mmol/l |
| soluție de oligoelemente [punctul 17 litera (c); A.13]                            | 10,0 ml                |
| extract de drojdie  | 100 g                  |
| se dizolvă în apă de diluție (punctul 14) și se ajustează la:                     | 1 000 ml               |

A.13 (c) Soluția de oligoelemente, preparată cu următoarele componente:

|  |          |
|--|----------|
| clorură de mangan (II) tetrahidrat ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )   | 0,5 g    |
| acid ortoboric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )   | 0,05 g   |
| clorură de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ )  | 0,05 g   |
| clorură de cupru (II) ( $\text{CuCl}_2$ )  | 0,03 g   |
| molibdat de sodiu dihidrat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 0,01 g   |
| clorură de cobalt (II) hexahidrat ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )    | 1,0 g    |
| clorură de nichel (II) hexahidrat ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )    | 0,1 g    |
| selenit de disodiu ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )                                   | 0,05 g   |
| se dizolvă în apă de diluție (punctul 14) și se ajustează la:                      | 1 000 ml |

A.14 Punctul 25: Testul preliminar

Este esențial să se efectueze un test preliminar conform descrierii de la punctul 24, exceptând nivelul concentrației de materii solide din nămol care trebuie să fie echivalent cu o sutime din concentrațiile indicate, și anume 0,1g/l, 0,2g/l și 0,4g/l. Durata incubației trebuie să fie de cel puțin 7 zile.

*Notă:* În cadrul ring testului (5), volumul de spațiu superior a fost prea mare reprezentând 75 % din volumul total; acesta trebuie să se încadreze în intervalul recomandat de 10 %-40 %. Criteriul relevant este ca volumul de gaze produs pentru o inhibare de aproximativ 80 % să fie măsurabil cu o precizie acceptabilă (de exemplu, între  $\pm 5\%$  și  $\pm 10\%$ ).

A.15 Punctele 26-30: Adăugarea substanței chimice de testare, a inoculului și a substratului.

Adăugările se realizează în același mod ca cel descris la prezentele puncte, însă soluția de substraturi (punctul 17) se înlocuiește cu mediul de testare la care se adaugă substratul de extract de drojdie (A.11).

De asemenea, concentrația finală a materiilor solide din nămol este redusă de la 2 g/l – 4 g/l la  $0,2 \pm 0,05$  g/l (A.9). În tabelul A.1, care înlocuiește tabelul de la punctul 29, sunt furnizate două exemple de adăugare de componente la amestecul de testare.

A.16 Punctul 33: Incubarea flacoanelor

Ca urmare a vitezei scăzute estimate a producției de gaze, incubarea durează cel puțin 7 zile.

▼ **M6**

## A.17 Punctul 34: Măsurători ale presiunii

Se utilizează aceeași procedură pentru măsurarea presiunii în spațiul superior al flacoanelor, astfel cum se descrie la punctul 34, în cazul în care este necesară analiza cantităților în faza gazoasă. Dacă trebuie măsurate cantitățile totale de  $\text{CO}_2$  și  $\text{CH}_4$ , pH-ul în faza lichidă este redus la aproximativ pH 2 prin injectarea de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  în fiecare flacon relevant și prin măsurarea presiunii după 30 de minute de agitare la temperatura testului. Cu toate acestea, informații suplimentare cu privire la calitatea inoculului pot fi obținute prin măsurarea presiunii în fiecare flacon înainte și după acidificare. De exemplu, dacă viteza de producere de  $\text{CO}_2$  este mult mai mare decât cea de producere a metanului, sensibilitatea bacteriilor fermentative poate fi modificată și/sau bacteriile metanogene sunt preferențial afectate de substanța chimică de testare.

## A.18 Punctul 36: măsurarea pH-ului

Dacă trebuie utilizat  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , trebuie pregătite anumite flacoane suplimentare, în care nu se adaugă  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , în special pentru măsurarea pH-ului.

## BIBLIOGRAFIE:

Madsen, T, Rasmussen, HB și Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tabelul A.1

## Exemple de organizare a testului pentru loturile de testare

| Constituenții amestecului de reacție                                | Exemplul 1 | Exemplul 2 | Ordinea normală a adăugării |
|---|------------|------------|-----------------------------|
| Concentrația inoculului preparat (g/l)                              | 0,42       | 2,1        | —                           |
| Volumul inoculului adăugat (ml)                                     | 45         | 9          | 4                           |
| Concentrația inoculului din flacoanele de testare (g/l)             | 0,20       | 0,20       | —                           |
| Volumul mediului de testare adăugat (ml)                            | 9          | 9          | 2                           |
| Volumul apei de diluție adăugată (ml)                               | 36         | 72         | 3                           |
| Concentrația extractului de drojdie din flacoanele de testare (g/l) | 9,7        | 9,7        | —                           |
| Volumul soluției stoc de substanță chimică de testare (ml)          | 3          | 3          | 1                           |
| Volumul total de lichid (ml)  | 93         | 93         | —                           |

**▼ M6***Apendicele 5***Definiții**

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

**„Substanță chimică”** înseamnă o substanță sau un amestec.

**„Substanță chimică de testare”** înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

## ▼ M6

C.35. TEST DE TOXICITATE PE *LUMBRICULUS* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 225 (2007). Animalele endobentice care îngerează sedimente sunt supuse unui risc potențial ridicat de expunere la substanțele chimice legate de sedimente și, în consecință, trebuie să li se acorde o atenție deosebită, de exemplu, referințele (1), (2), (3). Printre aceste organisme care îngerează sedimente, oligochetele acvatice joacă un rol important în sedimentele sistemelor acvatice. Prin implicarea lor în bioturbarea sedimentului și prin funcția lor de pradă, aceste animale pot avea o puternică influență asupra biodisponibilității respectivelor substanțe chimice pentru alte organisme, de exemplu peștii care se hrănesc cu organisme bentice. Spre deosebire de organismele epibentice, oligochetele acvatice endobentice (de exemplu, *Lumbriculus variegatus*) se ascund în sediment și îngerează particule sedimentare de sub suprafața sedimentară. Acest lucru asigură expunerea organismelor de testare la substanța chimică de testare prin toate căile posibile de absorbție (de exemplu, contactul cu particule sedimentare contaminate și ingerarea acestora, dar și prin intermediul apei interstițiale și al apei acoperitoare).
2. Această metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele unei expuneri prelunge a oligochetelor endobentice *Lumbriculus variegatus* (Müller) la substanțele chimice asociate sedimentelor. Aceasta se bazează pe protocoalele existente de testare a toxicității și a bioacumulării din sedimente, de exemplu, referințele (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoda este descrisă pentru condiții statice de testare. Scenariul de expunere utilizat în cadrul acestei metode de testare este îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare. Utilizarea sedimentului îmbogățit este prevăzută pentru simularea unui sediment contaminat cu substanța chimică de testare.
3. De obicei, substanțele chimice care trebuie testate din punctul de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă timp îndelungat în acest compartiment. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse prin mai multe căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective și de destinația sa finală în animal. Pentru substanțele chimice puternic absorbante (de exemplu, cu  $\log K_{ow} > 5$ ) sau pentru substanțele chimice cu legături covalente cu sedimentul, ingerarea de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea respectivelor substanțe chimice, hrana necesară pentru reproducerea și creșterea organismelor de testare se adaugă la sediment înainte de aplicarea substanței chimice de testare (11). Metoda de testare descrisă este suficient de detaliată astfel încât testul să poată fi efectuat permițând în același timp adaptări ale modelului experimental în funcție de condițiile din anumite laboratoare și de caracteristicile variate ale substanțelor chimice de testare.
4. Metoda de testare are ca scop determinarea efectelor unei substanțe chimice de testare asupra reproducerii și a biomasei organismelor de testare. Parametrii biologici măsurați sunt numărul total de viermi supraviețuitori și biomasa (greutatea uscată) la finalul expunerii. Aceste date sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza un efect de  $x$  % (de exemplu,  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  și  $EC_{10}$ ) sau cu ajutorul verificării unei ipoteze statistice pentru a determina concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC).
5. Capitolul C. 27 din prezenta anexă „Test de toxicitate pe chironomide cu utilizarea de sediment îmbogățit” (6), furnizează numeroase detalii esențiale și utile pentru aplicarea metodei de testare a toxicității asupra sedimentului. În consecință, acest document servește drept bază pentru efectuarea modificărilor necesare efectuării de teste de toxicitate asupra sedimentelor cu *Lumbriculus variegatus*. Alte documente la care se face referire sunt de exemplu „ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation

▼ **M6**

of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates” (3), „U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates” (7) și „ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates” (12). În plus, experiența practică dobândită pe parcursul ring testului metodei de testare [(13), raportul privind ring testul] și detalii din literatura de specialitate reprezintă surse importante de informații pentru redactarea prezentului document.

**CONDIȚII PREALABILE ȘI RECOMANDĂRI**

6. Înainte de începerea studiului, trebuie obținute informații cu privire la substanța chimică de testare, cum ar fi măsurile de precauție pentru asigurarea siguranței, condițiile adecvate de depozitare și metodele analitice. Orientări cu privire la substanțele chimice de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (14).
7. Înainte de efectuarea unui test, sunt necesare următoarele informații privind substanța chimică de testare:
  - denumirea comună, denumirea chimică (de preferat, denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea;
  - presiunea de vapori;
  - solubilitatea în apă.
8. Următoarele informații suplimentare sunt considerate utile înainte de începerea testului:
  - coeficientul de partiție octanol/apă,  $K_{ow}$ ;
  - coeficientul de partiție carbon organic/apă, exprimat sub forma  $K_{oc}$ ;
  - hidroliza;
  - fototransformarea în apă;
  - biodegradabilitatea;
  - tensiunea superficială.
9. Înainte de începerea testului, trebuie obținute informații cu privire la anumite caracteristici ale sedimentului care urmează să fie utilizat (7). Pentru detalii a se vedea punctele (22)-(25).

**PRINCIPIUL TESTULUI**

10. Viermii aflați într-o stare fiziologică similară (sincronizați conform descrierii din appendicele 5) sunt expuși la o serie de concentrații toxice aplicate fazei de sediment a unui sistem sediment-apă. Ca mediu trebuie utilizate un sediment artificial și apă reconstituită. Vasele de testare fără adăugarea substanței chimice de testare servesc drept vase de control. Substanța chimică de testare este introdusă în sediment în cantitate mare pentru fiecare nivel de concentrație în vederea reducerii la minimum a variabilității între duplicatele pentru fiecare nivel de concentrație, iar organismele de testare sunt introduse ulterior în vasele de testare în care au fost echilibrate concentrațiile de sediment și de apă [a se vedea punctul (29)]. Animalele de testare sunt expuse la sistemele sediment-apă pentru o perioadă de 28 de zile. Având în vedere conținutul scăzut de nutrienți din sedimentul artificial, sedimentul trebuie îmbogățit cu o sursă de hrană (a se vedea punctele 22-23 și appendicele 4) pentru a garanta creșterea și reproducerea viermilor în condiții controlate. Se asigură astfel expunerea animalelor prin intermediul apei și a sedimentului, precum și prin intermediul hranei lor.
11. Punctul final preferat al acestui tip de studiu este  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  și  $EC_{10}$ ; concentrația efectivă, care afectează x % din organismele de testare) pentru reproducere și, respectiv, biomasă comparativ cu vasul de control. Cu toate acestea, având în vedere gradul mare de incertitudine

▼ **M6**

privind valorile scăzute ale  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{25}$ ) cu limite de încredere de 95 % extrem de ridicate [de exemplu, (15)] și puterea statistică calculată pe parcursul verificării ipotezei, trebuie observat faptul că  $EC_{50}$  este considerată ca fiind punctul final cel mai fiabil. În plus, concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pot fi calculate pentru biomasă și reproducere, în cazul în care proiectul testului și datele susțin aceste calcule (a se vedea punctele 34-38). Scopul studiului, calculul  $EC_x$  sau NOEC, va determina proiectul testului.

**TEST DE REFERINȚĂ**

12. Se preconizează ca performanțele organismelor de control să demonstreze într-o măsură suficientă capacitatea unui laborator de a efectua testul și, în cazul în care sunt disponibile date istorice, repetabilitatea testului. În plus, pot fi efectuate, la intervale regulate, teste de toxicitate de referință utilizând o substanță toxică de referință pentru evaluarea sensibilității organismelor de testare. Numai testele de toxicitate de referință cu durata de 96 de ore pot demonstra într-un mod satisfăcător sensibilitatea și starea animalelor de testare (4)(7). Informații privind toxicitatea pentaclorfenolului (PCP) în teste efectuate (28 de zile de expunere la un sediment îmbogățit) sunt incluse în apendicele 6 și în raportul privind ring testul metodei de testare (13). Toxicitatea acută a PCP doar în prezența apei este descrisă, de exemplu, în referința (16). Aceste informații pot fi utilizate pentru compararea sensibilității organismelor de testare în testele de referință cu PCP ca substanță toxică de referință. Clorura de potasiu (KCl) sau sulfatul de cupru ( $CuSO_4$ ) au fost recomandate ca substanțe toxice de referință pentru *L. variegatus* (4)(7). În prezent, este dificilă stabilirea unor criterii de calitate pe baza datelor privind toxicitatea pentru KCl din cauza lipsei de date din literatura de specialitate în ceea ce privește *L. variegatus*. Informații privind toxicitatea cuprului pentru *L. variegatus* sunt pot fi găsite în referințele (17)-(21).

**VALIDITATEA TESTULUI**

13. Pentru ca testul să fie valabil, trebuie să se îndeplinească următoarele cerințe:
  - Un ring test (13) a demonstrat că în cazul *Lumbriculus variegatus*, numărul mediu de viermi vii per probă duplicat în vasele de control trebuie să fi crescut cu un factor de cel puțin 1,8 la finalul expunerii comparativ cu numărul de viermi per probă duplicat de la începutul expunerii.
  - pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9 pe întreaga durată a testului.
  - Concentrația de oxigen din apa acoperitoare nu trebuie să fie mai mică de 30 % din valoarea de saturație din aer (VSA) la temperatura de testare aplicată pe parcursul testului.

**DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Sistemul de testare**

14. Se recomandă utilizarea sistemelor statice fără reînnoirea apei acoperitoare. În cazul în care raportul sediment/apă (a se vedea punctul 15) este corespunzător, o aerare ușoară va fi în mod normal suficientă pentru menținerea calității apei la niveluri acceptabile pentru organismele de testare (de exemplu, creșterea la maximum a nivelurilor de oxigen dizolvat, reducerea la minimum a acumulării de produse excretore). Sistemele semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi utilizate numai în cazuri excepționale, întrucât se așteaptă ca reînnoirea periodică a apei acoperitoare să afecteze echilibrul chimic (de exemplu, pierderi de substanță chimică de testare din sistemul de testare).

**Vasele și aparatura de testare**

15. Expunerea trebuie realizată în pahare de laborator din sticlă, de exemplu, de 250 ml și cu un diametru 6 cm. Se pot utiliza și alte vase din sticlă corespunzătoare, dar acestea trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru apa acoperitoare și sediment. În fiecare vas trebuie introdus un strat de aproximativ 1,5-3 cm de sediment preparat. Raportul dintre adâncimea

▼ **M6**

stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Vasele trebuie să aibă o capacitate corespunzătoare conformă cu rata de încărcare, și anume numărul de viermi de testare adăugați pe unitatea ponderală de sediment (a se vedea, de asemenea, punctul 39).

16. Vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu substanța chimică de testare trebuie să fie în întregime din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert. A se evita, pentru toate componentele echipamentelor, utilizarea de materiale care pot dizolva și absorbi substanța chimică de testare sau care pot elibera alte substanțe chimice și care pot avea un efect advers asupra animalelor de testare. Politetrafluoretilena (PTFE), oțelul inoxidabil și/sau sticla trebuie utilizate pentru orice echipament care intră în contact cu mediul de testare. Pentru substanțele chimice organice care se absorb în sticlă, ar putea fi necesară sticlă silanizată. În aceste situații, echipamentul va trebui eliminat după utilizare.

**Specia de testare**

17. Specia de testare utilizată în cadrul acestui tip de studiu este oligochetul de apă dulce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Această specie tolerează o gamă largă tipuri de sedimente și este utilizată pe scară largă pentru testarea toxicității și a bioacumulării din sedimente [de exemplu, (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Trebuie raportate originea animalelor de testare, confirmarea identității speciilor [de exemplu, (36)], precum și condițiile de cultură. Identificarea speciei nu este necesară înainte de fiecare test în cazul în care organismele provin dintr-o cultură internă.

**Creșterea organismelor de testare**

18. Pentru a avea un număr suficient de viermi pentru realizarea testelor de toxicitate asupra sedimentului, este utilă menținerea viermilor în cultura de laborator permanentă. Orientări privind metodele de creștere în laborator pentru *Lumbriculus variegatus* și sursele culturilor de pornire sunt furnizate în appendicele 5. Pentru detalii privind creșterea acestei specii, a se vedea referințele (3), (7), (27).
19. Pentru a garanta că testele sunt efectuate cu animale din aceeași specie, se recomandă stabilirea de specii individuale. Asigurați-vă că culturile și, în special, viermii utilizați în cadrul testelor nu prezintă boli și anomalii vizibile.

**Apa**

20. Se recomandă utilizarea, în cadrul testelor, de apă reconstituită conform capitolului C.1 din prezenta anexă (37) ca apă acoperitoare; aceasta poate fi utilizată și pentru culturile de viermi de laborator (pentru pregătire, a se vedea appendicele 2). Dacă este necesar, se poate utiliza apă naturală. Calitatea apei alese trebuie să permită creșterea și reproducerea speciilor de testare pe parcursul perioadelor de acclimatizare și de testare fără manifestarea vreunui aspect sau comportament anormal. S-a demonstrat că *Lumbriculus variegatus* supraviețuiește, crește și se reproduce în acest tip de apă (30) și este asigurată o standardizare maximă a condițiilor de testare și de creștere. În cazul în care se utilizează apă reconstituită, compoziția acesteia trebuie raportată, iar apa trebuie să fie caracterizată înainte de utilizare cel puțin în ceea ce privește pH-ul, conținutul de oxigen și duritate (exprimată în mg de CaCO<sub>3</sub>/l). Analiza micropoluantilor din apă înainte de utilizarea acesteia ar trebui să furnizeze informații utile (a se vedea, de exemplu, appendicele 3).
21. pH-ul apei acoperitoare trebuie să se încadreze între 6,0 și 9,0 (a se vedea punctul 13). În cazul în care se preconizează degajarea unei cantități mari de amoniac, se consideră utilă menținerea pH-ului în limitele de 6,0 și 8,0. Pentru testarea de exemplu a unor acizi organici slabi, se recomandă ajustarea pH-ului prin tamponarea apei care urmează să fie utilizată în cadrul testului, conform descrierii, de exemplu, din referința (16). Duritatea totală a apei care urmează să fie utilizată în cadrul testului trebuie să se încadreze între 90 și 300 mg de CaCO<sub>3</sub>/litru de apă naturală. Appendicele 3 sintetizează alte criterii pentru o apă de diluție acceptabilă conform Orientării nr. 210 a OCDE (38).



▼ **M6****Sedimentul**

22. Având în vedere că sedimentele naturale necontaminate provenite dintr-o anumită sursă ar putea să nu fie disponibile pe tot parcursul anului, iar organismele indigene, precum și prezența micropoluantilor pot influența testul, trebuie utilizat de preferință un sediment preparat (denumit, de asemenea, sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Utilizarea unui sediment preparat limitează variabilitatea condițiilor de testare, precum și introducerea unei faune indigene. Următorul sediment preparat se bazează pe sedimentul artificial descris în referințele (6), (39) și (40). Este recomandat a fi utilizat în cadrul acestui tip de test [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:
- (a) 4-5 % mușchi de turbă (greutate uscată); este important să se utilizeze turbă sub formă de pudră, grad de descompunere: „mediu”, fin mărunțită (dimensiunea particulelor  $\leq 0,5$  mm) și uscată numai cu aer.
  - (b)  $20 \pm 1$  % (greutate uscată) argilă caolinică (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %).
  - (c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (nisip fin, granulație:  $\leq 2$  mm, însă  $> 50$  % din particule trebuie să se încadreze în intervalul 50-200  $\mu\text{m}$ ).
  - (d) Apă deionizată, 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului, în plus față de componentele sedimentului uscat.
  - (e) Se adaugă carbonat de calciu de calitate chimică pură ( $\text{CaCO}_3$ ) pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului.
  - (f) Conținutul total de carbon organic (TOC) din amestecul final trebuie să fie de 2 % ( $\pm 0,5$  %) din greutatea uscată a sedimentului și trebuie să fie ajustat prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).
  - (g) Hrana, de exemplu frunze de urzică mică (*Urtica* sp., în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consumul uman) sub formă de pulbere sau un amestec de frunze *Urtica* sp. sub formă de pulbere și celuloză alfa (1:1), la 0,4 – 0,5 % din greutatea uscată a sedimentului, în plus față de componentele sedimentului uscat; pentru detalii a se vedea apendicele 4.
23. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, de argilă caolinică, de hrană și de nisip. În plus față de cele enunțate la litera (g), în capitolul C.27 din prezenta anexă (6) sunt enumerate alte substanțe vegetale care trebuie utilizate ca sursă de hrană: frunze deshidratate de dud (*Morus alba*), trifoi alb (*Trifolium repens*), spanac (*Spinacia oleracea*) sau cereale.
24. Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul introducerii în sediment a substanței chimice de testare. Sursa de hrană aleasă trebuie să permită cel puțin o reproducere acceptabilă în vasele de control. Analiza micropoluantilor din sedimentul artificial sau din constituenți înainte de utilizare ar putea furniza informații utile. În apendicele 4 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul este suficient condiționat (a se vedea, de asemenea, punctul 25 și apendicele 4). Sedimentul artificial trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea constituenților, prin distribuția dimensiunii granulelor (procentul de nisip, de silt și de argilă), prin conținutul total de carbon organic (TOC), prin conținutul de apă și prin pH-ul său. Măsurarea potențialului redox este opțională.
25. Dacă este necesar, de exemplu în scopul unei testări specifice, sedimentele naturale provenite din locuri nepoluate pot servi, de asemenea, drept sediment de testare și/sau de cultură (3). Cu toate acestea, în cazul utilizării unui sediment natural, acesta trebuie caracterizat cel puțin prin originea (locul prelevării), pH-ul și conținutul de amoniac din apa interstițială, prin conținutul total de carbon organic (TOC) și prin conținutul de azot, prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de silt și de argilă) și

▼ **M6**

prin procentul de apă (7) și nu trebuie să prezinte niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu organismele de testare sau care le-ar putea consuma. Măsurarea potențialului redox și a capacității de schimb de cationi este opțională. De asemenea, se recomandă ca, înainte de introducerea substanței chimice de testare, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. La finalul acestei perioade de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată.

26. Calitatea sedimentului care urmează să fie utilizat trebuie să permită supraviețuirea și reproducerea organismelor de control pe parcursul perioadei de expunere fără manifestarea vreunui aspect sau comportament anormal. Viermii de control trebuie introduși în sediment, iar aceștia trebuie să îngereze sedimentul. Reproducerea în vasele de control trebuie să fie cel puțin conformă cu criteriile de validitate descrise la punctul 13. Prezența sau absența granulelor de fecale pe suprafața sedimentului, care indică ingestia sedimentului de către viermi, trebuie înregistrată și poate fi utilă pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește căile de expunere. Informații suplimentare privind ingestia sedimentului pot fi obținute cu ajutorul metodelor descrise în referințele (24), (25), (44) și (45), în care se specifică ingestia sedimentului sau selectarea particulelor în organismele de testare.
27. Procedurile de manipulare a sedimentelor naturale înainte de utilizarea acestora în laborator sunt descrise în referințele (3), (7) și (12). Pregătirea și depozitarea sedimentului artificial recomandat a fi utilizat în cadrul testului pe *Lumbriculus* sunt descrise în apendicele 4.

#### **Aplicarea substanței chimice de testare**

28. Substanța chimică de testare trebuie introdusă în sediment. Întrucât se estimează că cele mai multe substanțe chimice au o solubilitate scăzută în apă, acestea trebuie să fie dizolvate într-un solvent organic corespunzător (de exemplu, acetonă, n-hexan, ciclohexan), într-un volum cât mai mic posibil pentru a pregăti soluția stoc. Soluția stoc trebuie diluată cu același solvent pentru a pregăti soluțiile de testare. Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței chimice de testare în solventul ales ar trebui să reprezinte principalele criterii pentru selectarea unui agent de solubilizare adecvat. Pentru fiecare nivel de concentrație, trebuie utilizat același volum de soluție corespunzătoare. Sedimentul trebuie îmbogățit în cantitate mare pentru fiecare nivel de concentrație în vederea reducerii la minimum a variabilității între duplicate a concentrației substanței chimice de testare. Fiecare dintre soluțiile de testare este apoi amestecată cu nisip cuarțos conform descrierii de la punctul 22 (de exemplu, 10 g de nisip cuarțos pentru fiecare vas de testare). Pentru imersiunea completă a nisipului cuarțos, un volum cuprins între 0,20 și 0,25 ml/g este considerat suficient. Apoi, solventul trebuie evaporat complet. Pentru a reduce la minimum pierderile de substanță chimică de testare prin coevaporare (de exemplu, în funcție de presiunea de vapori a substanței chimice), nisipul acoperit trebuie utilizat imediat după uscare. Nisipul uscat este amestecat cu cantitatea adecvată de sediment preparat la nivelul de concentrație corespunzător. Cantitatea de nisip provenit din amestecul de substanță de testare și de nisip trebuie să fie luată în considerare în momentul preparării sedimentului (astfel, sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip). Principalul avantaj al acestei proceduri este acela că, în principiu, nu este introdus în sediment niciun fel de solvent (7). Alternativ, de exemplu în cazul sedimentului natural, substanța chimică de testare poate fi adăugată prin încorporarea unei părți de sediment uscat și fin măcinat conform descrierii de mai sus pentru nisipul cuarțos sau prin amestecarea substanței chimice de testare în sedimentul umed, evaporând apoi orice agent de solubilizare utilizat. Trebuie să se asigure distribuția completă și uniformă în sediment a substanței chimice de testare adăugate la sediment. Dacă este necesar,

## ▼ M6

subșanțioanele pot fi analizate pentru a confirma concentrațiile vizate din sediment și pentru a determina gradul de omogenitate. De asemenea, ar putea fi utilă analiza subșanțioanelor soluțiilor de testare pentru a confirma concentrațiile vizate din sediment. Întrucât se utilizează un solvent pentru depunerea substanței chimice de testare peste nisipul cuarțos, trebuie utilizat un vas de control cu solvent pregătit cu aceeași cantitate de solvent ca și sedimentele de testare. Trebuie raportate metoda utilizată pentru îmbogățire și motivele alegerii unei anumite proceduri de îmbogățire diferită de cea descrisă mai sus. Metoda de îmbogățire poate fi adaptată la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare, de exemplu, pentru a se evita pierderile cauzate de volatilizare pe parcursul procesului de îmbogățire sau de echilibrare. Orientări suplimentare privind procedurile de îmbogățire sunt furnizate în Environment Canada (1995) (46).

29. După pregătirea sedimentului îmbogățit, distribuirea acestuia în vasele de testare duplicat și adăugarea de apă de testare, este de preferat să se permită distribuția substanței chimice de testare din sediment în faza apoasă [de exemplu, (3)(7)(9)]. De preferință, această operațiune trebuie să se facă în aceleași condiții de temperatură și aerare ca și cele utilizate în test. Perioada de echilibrare corespunzătoare depinde de sediment și de substanțele chimice și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4-5 săptămâni) [de exemplu, (27)(47)]. În cadrul acestui test nu este necesar un echilibru complet, însă se recomandă o perioadă de echilibrare cuprinsă între 48 de ore și 7 zile. Astfel, timpul de degradare a substanței chimice de testare va fi redus la minimum. În funcție de scopul studiului, de exemplu, atunci când sunt reproduse condițiile de mediu, sedimentul îmbogățit poate fi echilibrat sau maturat pentru o perioadă mai mare.
30. La finalul acestei perioade de echilibrare, trebuie prelevate probe cel puțin din apa acoperitoare și din masa de sediment, cel puțin la cea mai mare și la cea mai mică concentrație pentru analiza concentrației substanței chimice de testare. Aceste determinări analitice ale substanței chimice de testare permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor inițiale măsurate. În general, prelevarea de probe împiedică sau distruge sistemul sediment-apă. În consecință, nu este posibil de obicei să se utilizeze aceleași duplicate pentru prelevarea de probe de sediment și viermi. Trebuie pregătite vase „analitice” suplimentare de dimensiuni corespunzătoare, tratate în același mod (inclusiv prin prezența organismelor de testare), însă nu trebuie utilizate pentru observații biologice. Dimensiunile vaselor de testare trebuie selectate pentru a preleva cantitățile de probe impuse de metoda analitică. Detalii privind prelevarea de probe sunt prezentate la punctul 53.

## DESFĂȘURAREA TESTULUI

**Testul preliminar**

31. În cazul în care nu este disponibilă nicio informație privind toxicitatea substanței chimice de testare pentru *Lumbriculus variegatus*, ar putea fi utilă realizarea unui test preliminar pentru a determina intervalul de concentrații care trebuie testate în cadrul testului final și pentru a optimiza condițiile de testare ale testului final. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații ale substanței chimice de testare, distribuite la intervale mari. Viermii sunt expuși la fiecare nivel de concentrație a substanței chimice de testare pentru o perioadă (de exemplu, 28 de zile ca în cazul testului final) care permite estimarea concentrațiilor de testare corespunzătoare; nu sunt necesare duplicate. Comportamentul viermilor, de exemplu evitarea sedimentului, care poate fi cauzată de substanța chimică de testare și/sau de sediment, trebuie observat și înregistrat pe parcursul unui test preliminar. Concentrațiile mai mari de 1 000 mg/kg de greutate uscată de sediment nu trebuie testate în cadrul testului preliminar.

**Testul final**

32. În cadrul testului final, trebuie utilizate și selectate cel puțin cinci concentrații, de exemplu pe baza rezultatului testului preliminar de stabilire a intervalului (punctul 31) și conform descrierii de la punctele 35, 36, 37 și 38.

▼ **M6**

33. Un vas de control (pentru duplicare, a se vedea punctele 36, 37 și 38) care conține toți constituenții, cu excepția substanței chimice de testare, este tratat în paralel cu seria de testare. În cazul în care nu se utilizează niciun agent de solubilizare pentru aplicarea substanței chimice de testare, acest lucru nu ar trebui să aibă niciun efect semnificativ asupra organismelor de testare, astfel cum se demonstrează cu ajutorul unui vas de control suplimentar care conține doar solvent.

**Proiectul testului**

34. Proiectul testului se referă la selectarea numărului și a intervalelor de concentrații de testare, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de viermi adăugați pentru fiecare vas. Modelele pentru estimarea  $EC_{x\%}$ , pentru estimarea NOEC și pentru efectuarea unui test la valori-limită sunt descrise la punctele 35, 36, 37 și 38.
35. Concentrațiile efective (de exemplu,  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$ ,  $EC_{10}$ ) și intervalul de concentrații în care efectul substanței de testare prezintă interes trebuie să fie cuprinse în seria concentrațiilor incluse în test. Trebuie evitată extrapolarea la valori mult sub cel mai mic nivel de concentrație care afectează organismele de testare sau la valori mai mari decât cel mai mare nivel de concentrație testată. Dacă – în cazuri excepționale – se realizează o astfel de extrapolare, trebuie furnizată o explicație completă în raport.
36. Dacă trebuie estimată valoarea  $EC_{x\%}$ , trebuie testate cel puțin cinci niveluri de concentrație și minimum trei probe duplicate pentru fiecare nivel de concentrație; se recomandă utilizarea a șase probe duplicate pentru vasul de control sau – în cazul în care este utilizat – pentru vasul de control cu solvent pentru a îmbunătăți estimarea variabilității între vasele de control. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a concentrației are o înclinare mică). Numărul de probe duplicate pentru fiecare tratament poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri cuprinse în intervalul 5 – 95 %. La creșterea numărului de probe duplicate sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta.
37. În cazul în care trebuie estimate valorile LOEC/NOEC, trebuie utilizate cel puțin cinci concentrații de testare cu cel puțin patru probe duplicate (se recomandă șase probe duplicate pentru vasul de control sau – în cazul în care este utilizat – pentru vasul de control cu solvent pentru a îmbunătăți estimarea variabilității între vasele de control), iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei de testare sunt furnizate în apendicele 6.
38. Se poate efectua un test la valori-limită (utilizând o concentrație de testare și vase de control), în cazul în care nu se preconizează niciun efect până la 1 000 mg/kg de greutate uscată de sediment (de exemplu, în urma unui test preliminar de stabilire a intervalului) sau în cazul în care testarea la un singur nivel de concentrație va fi adecvată pentru confirmarea unei valori NOEC de interes. În acest din urmă caz, trebuie inclus în raportul de testare o argumentație detaliată a selectării concentrației-limită. Scopul testului la valori-limită este de a efectua un test la o concentrație suficient de mare pentru a permite factorilor de decizie să excludă efectele posibil toxice ale substanței chimice, iar limita este stabilită la o concentrație care nu este probabil să apară în nicio situație. Se recomandă 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicate atât pentru tratament, cât și pentru probele de control. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei de testare sunt furnizate în apendicele 6.

**Condiții de expunere***Organismele de testare*

39. Testul se efectuează cu cel puțin 10 viermi pentru fiecare probă duplicate utilizată pentru determinarea parametrilor biologici. Acest număr de viermi corespunde cu aproximativ 50 – 100 mg de biomasă umedă. La un conținut de materie uscată estimat la 17,1 % (48), se obține aproximativ 9 – 17 mg de biomasă uscată per vas. U.S. EPA [2000 (7)] recomandă utilizarea unei

**▼ M6**

rate de încărcare care să nu depășească 1: 50 (biomasă uscată: TOC). Pentru sedimentul preparat descris la punctul 22, această rată corespunde cu aproximativ 43 g de sediment (greutate uscată) pentru 10 viermi la un conținut TOC de 2,0 % de sediment uscat. În cazul utilizării unui număr mai mare de 10 viermi per recipient, cantitatea de sediment și de apă acoperitoare trebuie ajustată în consecință.

40. Viermii utilizați în cadrul unui test trebuie să provină toți din aceeași sursă și trebuie să se afle într-o stare fiziologică similară (a se vedea apendicele 5). Trebuie selectați viermi de dimensiuni similare (a se vedea punctul 39). Se recomandă ca un subșantion din lotul sau stocul de viermi să fie cântărit înainte de test pentru estimarea greutății medii.
41. Viermii care urmează să fie utilizați în cadrul unui test sunt extrași din cultură (pentru detalii a se vedea apendicele 5). Animalele (adulte) de mari dimensiuni care nu prezintă semne de fragmentare recentă sunt transferate în recipiente din sticlă (de exemplu, vase Petri) care conțin apă curată. Acestea sunt apoi sincronizate conform descrierii din apendicele 5. După o perioadă de regenerare de 10-14 zile, trebuie utilizați pentru test viermii intacți și întregi de dimensiuni similare, care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui ușor stimul mecanic. În cazul în care condițiile de testare diferă de condițiile de cultură (de exemplu, în ceea ce privește temperatura, lumina și apa acoperitoare), o etapă de aclimatizare, de exemplu, de 24 de ore cu parametri de temperatură, de lumină și de apă acoperitoare identici cu cei ai testului ar trebui să fie suficientă pentru adaptarea viermilor la condițiile de testare. Oligochetele adaptate trebuie distribuite aleatoriu în vasele de testare.

*Hrănirea*

42. Întrucât hrana este adăugată la sediment înaintea (sau pe parcursul) aplicării substanței chimice de testare, viermii nu sunt hrăniți suplimentar pe parcursul testului.

*Lumina și temperatura*

43. Perioada de expunere la lumină aplicată culturii și în cadrul testului este de obicei de 16 ore (3), (7). Intensitatea luminii trebuie menținută la un nivel scăzut (de exemplu, 100-500 lx) pentru a imita condițiile naturale la suprafața sedimentului și trebuie măsurată cel puțin o dată pe parcursul perioadei de expunere. Temperatura trebuie să fie de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pe tot parcursul testului. La o anumită dată de măsurare, diferența de temperatură dintre vasele de testare nu trebuie să fie mai mare de  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vasele de testare trebuie așezate în incubatorul de testare sau în zona de testare într-un mod aleatoriu, de exemplu, pentru a reduce la minimum eroarea de reproducere determinată de locul vasului.

*Aerarea*

44. Apa acoperitoare din vasele de testare trebuie să fie supusă unui ușor proces de aerare (de exemplu, 2-4 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului astfel încât să limiteze perturbațiile. Concentrația de oxigen dizolvat nu trebuie să scadă sub 30 % din valoarea de saturație din aer (VSA). Aportul de aer trebuie controlat și – dacă este necesar – ajustat cel puțin o dată pe zi în zilele lucrătoare.

**Măsurători ale calității apei**

45. Următorii parametri de calitate a apei trebuie măsurați în apa acoperitoare:

|              |   |
|--------------|---|
| Temperatura: | cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere; dacă este posibil, temperatura din mediul înconjurător (aerul înconjurător sau baia de apă) trebuie, de asemenea, înregistrată, de exemplu la intervale de o oră; |
|--------------|---|

▼ **M6**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Conținutul de oxigen dizolvat: | cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere; exprimat în mg/l și % din VSA (valoarea de saturare din aer);  |
| Aportul de aer:                | trebuie controlat cel puțin o dată pe zi în zilele lucrătoare și – dacă este necesar – trebuie ajustat;  |
| pH-ul:                         | cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere;  |
| Duritatea totală a apei:       | cel puțin într-o probă duplicat din vasele de control și într-un vas de testare cu cea mai mare concentrație la începutul și la încheierea perioadei de expunere; exprimată în mg/l CaCO <sub>3</sub> ;  |
| Conținutul total de amoniac:   | cel puțin într-o probă duplicat din vasele de control și într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație la începutul și la încheierea perioadei de expunere și, ulterior, de 3 ori pe săptămână; exprimată în mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> sau NH <sub>3</sub> sau azot amoniacal total. |

În cazul în care parametrii de calitate a apei necesită prelevarea unor probe semnificative de apă din vase, se recomandă pregătirea unor vase separate pentru efectuarea măsurătorilor calității apei astfel încât să nu se modifice raportul volumic apă-sediment.

**Observații biologice**

46. Pe parcursul expunerii, vasele de testare trebuie observate în vederea evaluării vizuale a oricărei diferențe de comportament manifestată de viermi (de exemplu, evitarea sedimentului, granule de fecale vizibile pe suprafața sedimentului) comparativ cu vasele de control. Observațiile trebuie înregistrate.
47. La finalul testului, fiecare probă duplicat este examinată (pot fi excluse de la examinare vasele suplimentare destinate analizelor chimice). Trebuie utilizată o metodă corespunzătoare pentru a recupera toți viermii din vasul de testare. Trebuie avut grijă ca toți viermii să fie recuperați nevătămați. O metodă posibilă este strecurarea viermilor din sediment. Poate fi utilizată o plasă din oțel inoxidabil cu o dimensiune adecvată a ochiurilor. Apa acoperitoare este decantată la maximum cu atenție, iar reziduurile de sediment și de apă sunt agitate pentru a obține o suspensie consistentă care poate fi strecurată. Dacă se utilizează o sită cu ochiuri de 500 μm, cea mai mare parte a particulelor de sediment vor trece foarte rapid prin aceasta; cu toate acestea, strecurarea trebuie efectuată rapid pentru a împiedica viermii să pătrundă în sită sau să treacă prin ochiurile acesteia. Utilizarea unei site cu ochiuri de 250 μm va împiedica viermii să pătrundă în sită sau să treacă prin ochiurile acesteia; cu toate acestea, a se avea grijă ca în sită să se rețină o cantitate cât mai mică posibil de particule de sediment. Suspensia strecurată din fiecare vas duplicat poate fi strecurată pentru a doua oară pentru a garanta recuperarea tuturor viermilor. O metodă alternativă ar putea fi încălzirea sedimentului prin așezarea vaselor de testare într-o baie de apă la o temperatură cuprinsă între 50 și 60 °C; viermii vor părăsi sedimentul și pot fi colectați de pe suprafața sedimentului cu ajutorul unei pipete cu gura largă lustruită la foc. O altă metodă constă în obținerea unei suspensii de sediment și turnarea acesteia într-un recipient puțin adânc cu o dimensiune corespunzătoare. Viermii pot fi extrași din stratul subțire de suspensie cu ajutorul unui ac din oțel sau al unei pensete de ceasornicar (care trebuie utilizată mai degrabă ca o furculiță decât ca un clește pentru a se evita rănirea viermilor) și transferați în apă curată. După separarea lor de suspensia de sediment, viermii sunt clătiți în mediul de testare și numărați.
48. Indiferent de metoda utilizată, laboratoarele trebuie să demonstreze că personalul lor poate recupera în medie cel puțin 90 % din organisme din

**▼ M6**

întregul sediment. De exemplu, ar putea fi adăugat la sedimentul de probă sau la sedimentele de testare un anumit număr de organisme de testare, iar recuperarea acestora ar putea fi stabilită după 1 oră (7).

49. Numărul total de exemplare vii și moarte per probă duplicat trebuie înregistrat și evaluat. Sunt considerate moarte următoarele grupuri de viermi:

- a) nu există nicio reacție după un stimul mecanic ușor;
- b) există semne de descompunere (în combinație cu „a”)
- c) mai mulți viermi lipsă

În plus, viermii vii pot fi încadrați în una dintre următoarele trei categorii:

- a) viermi compleți de mari dimensiuni (adulți) fără regiuni de corp regenerate
- b) viermi compleți cu regiuni de corp regenerate, de culoare mai deschisă (și anume cu o parte posterioară nouă, cu o parte anterioară nouă sau atât cu partea posterioară, cât și cu partea anterioară noi)
- c) viermi incompleți (și anume, viermi fragmentați recent cu regiuni de corp neregenerate)

Aceste observații suplimentare nu sunt obligatorii, însă pot fi utilizate pentru o interpretare suplimentară a rezultatelor biologice (de exemplu, un număr mare de viermi incluși în categoria c poate indica o întârziere a reproducerii sau a regenerării determinată de un anumit tratament). În plus, dacă sunt observate eventuale diferențe de aspect (de exemplu, leziuni ale tegumentului, secțiuni de corp edematoase) între viermii tratați și cei din probele de control, acestea trebuie înregistrate.

50. Imediat după numărare/evaluare, viermii vii găsiți în fiecare probă duplicat sunt transferați în talere de balanță uscate, precântărite și etichetate (unul pentru fiecare probă duplicat) și eutanasiați cu o picătură de etanol pentru fiecare taler. Talerele sunt introduse într-o etuvă la o temperatură de  $100 \pm 5$  °C pentru a se usca peste noapte, apoi sunt cântărite după răcire într-un exsicator și este determinată greutatea uscată a viermilor (de preferință în g, cu cel puțin 4 zecimale).
51. În plus față de greutatea uscată totală, poate fi determinată greutatea uscată fără cenușă conform descrierii de la referința (49) pentru a număra componentele anorganice provenite din sedimentul ingerat, prezente în tractul alimentar al viermilor.
52. Biomasa determinată este biomasa totală pentru fiecare probă duplicat, incluzând viermii adulți și cei tineri. Viermii morți nu trebuie luați în considerare pentru determinarea biomasei pentru fiecare probă duplicat.

#### **Verificarea concentrațiilor de substanță chimică de testare**

##### *Prelevarea de probe*

53. Probele pentru analiza chimică a substanței chimice de testare trebuie prelevate cel puțin la concentrația cea mai mare și la o concentrație inferioară, cel puțin la finalul fazei de echilibrare (înainte de adăugarea organismelor de testare) și la finalul testului. Trebuie prelevate pentru analiză cel puțin probe din masa sedimentului și din apa acoperitoare. Trebuie prelevate cel puțin două probe per matrice și per tratament la fiecare dată de prelevare. Una dintre probele duplicat poate fi păstrată ca rezervă (pentru a fi analizată, de exemplu, în cazul în care analiza inițială nu se încadrează în intervalul de  $\pm 20$  % al concentrației nominale). În cazul unor proprietăți chimice specifice, de exemplu dacă se preconizează o degradare rapidă a substanței



▼ **M6**

chimice de testare, calendarul analitic poate fi ajustat (de exemplu, prelevări de probe mai frecvente, analiza mai multor niveluri de concentrație) pe baza avizului experților. Probele pot fi apoi prelevate la date de prelevare intermediare (de exemplu, la șapte zile după începerea perioadei de expunere).

54. Trebuie prelevate probe din apa acoperitoare prin decantarea sau sifonarea acesteia astfel încât să se reducă la minimum perturbarea sedimentului. Volumul probelor trebuie înregistrat.
55. După eliminarea apei acoperitoare, sedimentul trebuie să fie omogenizat și transferat într-un recipient corespunzător. Se înregistrează greutatea probei de sediment umed.
56. În cazul în care este necesară a analiză suplimentară a substanței chimice de testare din apa interstițială, probele de sediment omogenizat și cântărit trebuie centrifugate pentru a obține apă interstițială. De exemplu, aproximativ 200 ml de sediment umed pot fi introduse în pahare de laborator pentru centrifugare de 250 ml. Probele trebuie apoi centrifugate fără filtrare pentru a izola apa interstițială, de exemplu la  $10\,000 \pm 600 \times g$  timp de 30 – 60 de minute la o temperatură care să nu depășească temperatura utilizată în cadrul testului. După centrifugare, supernatantul este decantat sau prelevat cu pipeta având grijă să nu se introducă nicio particulă de sediment, iar volumul este înregistrat. Se înregistrează greutatea granulelor de sediment rămase. Acest lucru poate contribui la estimarea bilanțului masic sau a recuperării substanței chimice de testare din sistemul apă-sediment, în cazul în care greutatea uscată a sedimentului este determinată la fiecare dată de prelevare. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.
57. În cazul în care analiza nu se realizează imediat, toate probele trebuie depozitate printr-o metodă corespunzătoare, de exemplu, în condițiile de depozitare recomandate pentru degradarea minimă a substanței chimice de testare specifice (de exemplu, probele prelevate din mediu sunt de obicei depozitate la o temperatură de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  la întuneric). Trebuie obținute informații privind condițiile corespunzătoare de depozitare pentru substanța chimică de testare specifică – de exemplu, durata și temperatura de stocare, procedurile de extracție etc. – înainte de începerea studiului.

*Metoda analitică*

58. Întrucât întreaga procedură este determinată în esență de exactitatea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța chimică de testare, trebuie să se verifice în mod experimental dacă precizia și reproductibilitatea, precum și recuperarea substanței chimice de testare din apă și din probele de sediment sunt satisfăcătoare pentru metoda specifică cel puțin la concentrația de testare cea mai mare și la concentrația de testare cea mai scăzută. De asemenea, trebuie să se verifice ca substanța chimică de testare să nu poată fi detectată în camerele de control la concentrații mai mari decât limita de cuantificare. Dacă este necesar, se ajustează concentrațiile nominale pentru a ține cont de recuperările din probele de control de calitate (de exemplu, în cazul în care recuperarea nu se încadrează în intervalul de 80 – 120 % din cantitatea introdusă). Pe întreaga durată a testului, toate probele trebuie manipulate astfel încât să se reducă la minimum contaminarea și pierderile (rezultate, de exemplu, din absorbția substanței chimice de testare pe dispozitivul de prelevare a probelor).
59. Trebuie înregistrate și raportate recuperarea substanței chimice de testare, limita de cuantificare și limita de detecție în sediment și în apă.

**DATE ȘI RAPORT****Interpretarea rezultatelor**

60. Principalele variabile de răspuns obligatorii ale testului care trebuie evaluate din punct de vedere statistic sunt biomasa și numărul total de viermi per probă duplicat. Opțional, reproducerea (creșterea numărului de viermi) și creșterea (creșterea biomasei uscate) ar putea fi, de asemenea, evaluate. În acest caz, o estimare a greutății uscate a viermilor la începutul perioadei de expunere trebuie obținută, de exemplu prin măsurarea greutății uscate a unui subeșantion reprezentativ din lotul viermilor sincronizați utilizați în cadrul testului.



▼ **M6**

61. Cu toate că mortalitatea nu reprezintă un punct final de testare în prezentul test, aceasta ar trebui evaluată în măsura posibilului. În scopul estimării mortalității, numărul de viermi care nu reacționează la un stimul mecanic ușor sau care prezintă semne de descompunere, precum și viermii lipsă ar trebui considerați morți. Cazurile de mortalitate trebuie cel puțin înregistrate și luate în considerare în momentul interpretării rezultatelor.
62. Concentrațiile efective trebuie exprimate în mg/kg de greutate uscată de sediment. În cazul în care recuperarea substanței chimice de testare măsurată în sediment sau în sediment și în apa acoperitoare la începutul perioadei de expunere este cuprinsă între 80 și 120 % din concentrațiile nominale, concentrațiile efective ( $EC_x$ , NOEC, LOEC) pot fi exprimate pe baza concentrațiilor nominale. În cazul în care rata de recuperare se abate de la concentrațiile nominale cu un procent mai mare de  $\pm 20$  % din concentrațiile nominale, concentrațiile efective ( $EC_x$ , NOEC, LOEC) trebuie să se bazeze pe concentrațiile măsurate inițial la începutul perioadei de expunere, de exemplu luând în considerare bilanțul masic al substanței chimice de testare în sistemul de testare (a se vedea punctul 30). În aceste cazuri, informații suplimentare pot fi obținute din analiza soluțiilor stoc și/sau a soluțiilor de aplicare în vederea confirmării pregătirii corecte a sedimentelor de testare.

 **$EC_x$** 

63. Valorile  $EC_x$  pentru parametri descriși la punctul 60 se calculează utilizând metodele statistice adecvate (de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Kärber sau simpla interpolare). Orientări privind evaluarea statistică sunt disponibile în referințele (15) și (50). O valoare  $EC_x$  se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu  $x$  % din media probelor de control în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii  $EC_{50}$  sau a unei alte valori  $EC_x$ , mediile per tratament ( $\bar{X}$ ) trebuie supuse unei analize de regresie.

**NOEC/LOEC**

64. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecăre vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice corespunzătoare. În general, efectele adverse ale substanței de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la  $p \leq 0,05$ . Exemple sunt furnizate la punctele de mai jos. Orientări privind selectarea metodelor statistice adecvate sunt disponibile în referințele (15) și (50).
65. Distribuția normală a datelor poate fi testată, de exemplu cu ajutorul testului de calitate a ajustării Kolmogorov-Smirnov, al testului raportului interval/deviație standard (testul R/s) sau al testului Shapiro-Wilk (bilateral,  $p \leq 0,05$ ). Pentru testarea omogenității varianței, poate fi utilizat testul Cochran, testul Levene sau testul Bartlett (bilateral,  $p \leq 0,05$ ). În cazul în care sunt îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitatea varianței), se pot efectua o analiză de varianță (ANOVA) unilaterală și teste multicomparative ulterioare. Comparațiile pe perechi (de exemplu, testul t Dunnett) sau testele de stabilire a tendințelor (de exemplu, testul Williams) pot fi utilizate pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ( $p \leq 0,05$ ) între probele de control și diversele concentrații de substanță chimică de testare. În caz contrar, trebuie utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

**Test la valori-limită**

66. În cazul în care a fost efectuat un test la valori-limită (compararea probei de control cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), răspunsurile metrice (numărul total de viermi și biomasa ca greutate uscată de viermi) pot fi evaluate prin intermediul testului Student (testul t). Se poate utiliza testul t pentru varianță (testul t Welch) sau un test neparametric, precum testul U Mann-Whitney, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei sunt furnizate în apendicele 6.

**▼ M6**

67. Pentru determinarea diferențelor semnificative între vasele de control (vasul de control și vasul de control cu solvent), probele duplicate ale fiecărui vas de control pot fi testate conform descrierilor pentru testul la valori-limită. În cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate probele duplicate ale vaselor de control și ale vaselor de control cu solvent pot fi cumulate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu vasul de control cu solvent.

**Interpretarea rezultatelor**

68. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul unor abateri de la prezenta metodă de testare și în cazul în care concentrațiile de testare măsurate ating niveluri apropiate de limita de detecție a metodei analitice utilizate. Orice abatere de la prezenta metodă de testare trebuie notată.

**Raportul de testare**

69. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

— *Substanța chimică de testare*

- datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică pentru cuantificarea substanței chimice de testare; sursa substanței chimice de testare, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat.

- orice informație disponibilă privind natura fizică și proprietățile fizico-chimice obținute înainte de începerea testului (de exemplu, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), log  $K_{ow}$ , stabilitatea în apă etc.);

— *Specia de testare:*

- denumirea științifică, sursa, toate condițiile de pretratament, de aclimatizare, de cultură etc.

— *Condiții de testare:*

- procedura de testare utilizată (de exemplu, statică, semistatică sau în regim dinamic);
- proiectul testului (de exemplu, numărul, materialul și dimensiunea camerelor de testare, volumul de apă per vas, masa și volumul sedimentului per vas, (pentru procedurile în regim dinamic sau semistatic: viteza de înlocuire a volumului de apă), orice tip de aerare utilizat înainte și pe parcursul testului, numărul de probe duplicate, numărul de viermi per probă duplicate la începutul perioadei de expunere, numărul de concentrații de testare, durata condiționării, perioadele de echilibrare și de expunere, frecvența prelevării probelor);
- adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;
- metoda de pretratare a substanței chimice de testare și procesul de îmbogățire/aplicare;
- concentrațiile de testare nominale, detalii privind prelevarea de probe pentru analize chimice și metodele analitice prin care au fost obținute concentrațiile substanței chimice de testare;
- caracteristicile sedimentului descrise la punctele 24-25 și orice altă măsurătoare efectuată; pregătirea sedimentului preparat;
- pregătirea apei de testare (dacă se utilizează apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate și orice altă măsurătoare efectuată) înainte de începerea testului;
- informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire;

**▼ M6**

- intensitatea luminii și perioada (perioadele) de expunere la lumină;
  - metodele utilizate pentru determinarea tuturor parametrilor biologici (de exemplu, prelevarea de probe, inspecția, cântărirea organismelor de testare) și a tuturor parametrilor abiotici (de exemplu, parametrii de calitate a apei și a sedimentului);
  - volumul și/sau greutatea tuturor probelor destinate analizei chimice;
  - informații detaliate privind tratamentul tuturor probelor destinate analizei chimice, inclusiv detalii privind pregătirea, depozitarea, procedurile de îmbogățire, extracția și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța chimică de testare și recuperările substanței chimice de testare.
- *Rezultate:*
- calitatea apei din vasele de testare (pH-ul, temperatura, concentrația de oxigen dizolvat, duritatea, concentrațiile de amoniac și orice altă măsurătoare efectuată);
  - conținutul total de carbon organic (TOC), raportul greutate uscată/greutate umedă, pH-ul sedimentului și orice altă măsurătoare efectuată;
  - numărul total și, în cazul în care este determinat, numărul viermilor compleți și incompleți din fiecare cameră de testare la finalul testului;
  - greutatea uscată a viermilor din fiecare cameră de testare la finalul testului și, dacă este măsurată, greutatea uscată a unui subeșantion de viermi la începutul testului;
  - orice comportament anormal observat în comparație cu probele de control (de exemplu, evitarea sedimentului, prezența sau absența granulelor de fecale);
  - orice caz de mortalitate observat;
  - estimări ale punctelor finale toxice (de exemplu,  $EC_{50}$ , NOEC și/sau LOEC) și metodele statistice utilizate pentru determinarea acestora;
  - concentrațiile de testare nominale, concentrațiile de testare măsurate și rezultatele tuturor analizelor efectuate în scopul determinării concentrației substanței chimice de testare din vasele de testare;
  - orice abatere de la criteriile de validitate.
- *Evaluarea rezultatelor:*
- concordanța rezultatelor cu criteriile de validitate, astfel cum sunt enumerate la punctul 13;
  - discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) CE (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxemburg.
- (2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE), Paris.

▼ **M6**

- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. și Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Capitolul C.27 din prezenta anexă, Test de toxicitate pe chironomide cu utilizarea de sediment îmbogățit.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/\_\_\_\_
- (16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

## ▼ M6

- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. *Environmental Toxicology*. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. *Oblig. Biochem. Physiol. Part C* 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicol. Toxicol. Chem.* 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiol.* 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Toxicol. Toxicol. Chem.* 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Toxicol. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Toxicol. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Toxicol. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Toxicol. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of <sup>14</sup>C-17 $\alpha$ -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Toxicol. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000-2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼ **M6**

- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Toxicol. Sci.* **32**, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* **235/236**: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* **138**: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22*.
- (37) Capitolul C.1 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe pești.
- (38) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* **35**, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, **39**, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germania. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Toxicol. Toxicol. Chem.* **13**, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* **31**: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* **11**, 181-184.
- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* **8**, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Toxicol. Sci. Technol.* **23**, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Toxicol. Toxicol. Chem.* **15**, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Toxicol. Toxicol. Chem.* **18**, 1244-1249.

▼ **M6**

- (50) OCDE 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OCDE Series on Testing and Assessment No. 54, OCDE Paris, Franța.
- (51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germania. pp. 107-119.

**Bibliografie suplimentară privind procedurile statistice:**

- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Toxicol. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Toxicol. Sci. Technol. 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.
- 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.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.



▼ **M6***Apendicele 1***Definiții**

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

„**Substanță chimică**” înseamnă o substanță sau un amestec.

„**Perioada de condiționare**” este utilizată pentru stabilizarea componentei microbiene a sedimentului și pentru eliminarea, de exemplu, a amoniacului provenit din componentele sedimentului; aceasta se derulează înainte de îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare. De obicei, apa acoperitoare este eliminată după condiționare.

„**EC<sub>x</sub>**” înseamnă concentrația substanței chimice de testare din sediment din care rezultă un efect de X % (de exemplu 50 %) asupra unui parametru biologic într-o perioadă de expunere dată.

„**Perioada de echilibrare**” este utilizată pentru a permite distribuirea substanței chimice de testare între faza solidă, apa interstițială și apa acoperitoare; aceasta se derulează după îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare și înainte de adăugarea organismelor de testare.

„**Faza de expunere**” este perioada pe parcursul căreia organismele de testare sunt expuse la substanța chimică de testare.

„**Sedimentul preparat**” sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic este un amestec de materiale utilizate pentru simularea componentelor fizice a unui sediment natural.

„**Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)**” este cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect toxic semnificativ (la  $p \leq 0,05$ ) în raport cu proba de control. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. În cazul în care aceste două condiții nu pot fi îndeplinite, trebuie furnizată o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC).

„**Concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC)**” este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu proba de control, nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p \leq 0,05$ ), într-o perioadă de expunere dată.

„**Coeficientul de partiție octanol/apă**” ( $K_{ow}$ ; exprimat uneori prin  $P_{ow}$ ) este raportul solubilității unei substanțe chimice în n-octanol și în apă la echilibru și reprezintă lipofilia unei substanțe chimice (capitolul A.24 din prezenta anexă).  $K_{ow}$  sau logaritmul  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare a unei substanțe chimice de către organismele acvatice.

„**Coeficientul de partiție carbon organic/apă**” ( $K_{oc}$ ) este raportul dintre concentrația unei substanțe chimice în/pe fracția de carbon organic a unui sediment și concentrația de substanță chimică în apă la echilibru.

„**Apa acoperitoare**” este apa care acoperă sedimentul în vasul de testare.

„**Apa interstițială**” este apa care ocupă spațiul dintre particulele de sediment sau de sol.

„**Sedimentul îmbogățit**” este sedimentul la care se adaugă substanța chimică de testare.

„**Substanța chimică de testare**” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.



▼ **M6***Apendicele 2***Compoziția apei reconstituite recomandate**

[extras din Capitolul C.1 din prezenta anexă (1)]

(a) *Soluție de clorură de calciu*

Se dizolvă 11,76 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(b) *Soluție de sulfat de magneziu*

Se dizolvă 4,93 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(c) *Soluție de bicarbonat de sodiu*

Se dizolvă 2,59 g de  $\text{NaHCO}_3$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(d) *Soluție de clorură de potasiu*

Se dizolvă 0,23 g de KCl în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

Toate substanțele chimice trebuie să fie de puritate analitică.

Conductivitatea apei distilate sau deionizate nu trebuie să depășească  $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

Se amestecă 25 ml din fiecare dintre soluțiile menționate la litere (a)-(d) și se completează volumul total până la 1 litru cu apă deionizată. Suma ionilor de calciu și de magneziu din aceste soluții este de 2,5 mmol/l.

Proporția de ioni Ca:Mg este de 4:1, iar cea de ioni Na:K este de 10:1. Capacitatea acidă  $\text{K}_{\text{S}4,3}$  a acestei soluții este de 0,8 mmol/l.

Se aerează apa de diluție până la obținerea saturației de oxigen, apoi se depozitează pentru o perioadă de aproximativ două zile fără o altă aerare înainte de utilizare.

**REFERINȚĂ**

(1) Capitolul C.1 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe pești.

▼ **M6***Apendicele 3***Caracteristicile fizico-chimice ale unei ape de diluție acceptabile**

| Componentă   | Concentrații |
|--|--------------|
| Particule în suspensie                                       | < 20 mg/l    |
| Carbon organic total   | < 2 µg/l     |
| Amoniac neionizat  | < 1 µg/l     |
| Clor rezidual  | < 10 µg/l    |
| Pesticide organofosforice totale                             | < 50 ng/l    |
| Pesticide organoclorurate totale plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l    |
| Clor organic total   | < 25 ng/l    |
| [extras din OCDE (1992) (1)]                                 |              |

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

## ▼ M6

## Apendicele 4

**Sediment artificial recomandat – Orientări privind prepararea și depozitarea****Constituenții sedimentului**

| Constituent        | Caracteristici   | % din greutatea uscată a sedimentului |
|--------------------|--|---------------------------------------|
| Turbă              | Mușchi de turbă, grad de descompunere: „mediu”, uscat cu aer, fără reziduuri vizibile, fin măcinat (dimensiunea particulelor $\leq 0,5$ mm)  | $5 \pm 0,5$                           |
| Nisip cuarțos      | Granulație: $\leq 2$ mm, însă $> 50$ % din particule trebuie să se încadreze în intervalul 50-200 $\mu\text{m}$  | 75 – 76                               |
| Argilă caolinitică | Conținut de caolinit $\geq 30$ %   | $20 \pm 1$                            |
| Sursă de hrană     | De exemplu, pulbere de Urtica (Folia urticae), frunze de Urtica dioica (urzică mică), fin măcinate (dimensiunea particulelor $\leq 0,5$ mm); în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consum uman; adăugate la sedimentul uscat | 0,4 – 0,5 %                           |
| Carbon organic     | Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip   | $2 \pm 0,5$                           |
| Carbonat de calciu | $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, pur din punct de vedere chimic, adăugat la sedimentul uscat  | 0,05 – 1                              |
| Apă deionizată     | Conductivitate $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$ , adăugată la sedimentul uscat   | 30 – 50                               |

*Notă:* în cazul în care sunt prevăzute concentrații ridicate de amoniac, de exemplu, dacă se știe că substanța chimică de testare inhibă nitrificarea, ar putea fi utilă înlocuirea a 50 % din pudra de urzică bogată în azot cu celuloză [de exemplu, pudră de  $\alpha$ -celuloză, pură din punct de vedere chimic, dimensiunea particulelor  $\leq 0,5$  mm; (1) (2)].

**Pregătire**

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la  $5,5 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ . Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la  $20 \pm 2$  °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. pH-ul se măsoară din nou și trebuie să fie de  $6,0 \pm 0,5$ . Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolinitică) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă cuprins în intervalul 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară din nou pH-ul amestecului final și se ajustează în intervalul 6,5-7,5 cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Cu toate acestea, în cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, poate fi utilă menținerea pH-ului sedimentului sub 7,0 (de exemplu între 6,0 și 6,5). Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. În cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, sedimentul preparat poate fi condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior (de exemplu, raportul sediment-apă 1:4, adâncimea stratului de sediment identică cu cea din vasele de testare) înainte de a fi îmbogățit cu

**▼ M6**

substanța chimică de testare, și anume acesta trebuie acoperit cu apă care trebuie aerată. La finalul perioadei de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Nisipul cuarțos îmbogățit este apoi amestecat cu sedimentul pentru fiecare nivel de tratament, sedimentul este distribuit în vasele de testare duplicat și acoperit cu apă de testare. Vasele sunt apoi incubate în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior. În acest moment începe perioada de echilibrare. Apa de acoperire trebuie să fie aerată.

Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul introducerii în sediment a substanței chimice de testare. Aceasta poate fi amestecată în prealabil cu suspensia de turbă (a se vedea mai sus). Cu toate acestea, degradarea excesivă a sursei de hrană înainte de adăugarea organismelor de testare – de exemplu, în cazul unei perioade lungi de echilibrare – poate fi evitată prin limitarea cât mai mult posibil a perioadei dintre momentul adăugării hranei și începutul expunerii. Pentru a garanta îmbogățirea hranei cu substanța chimică de testare, sursa de hrană trebuie amestecată cu sedimentul cel târziu în ziua introducerii substanței chimice în sediment.

**Depozitare**

Constituenții uscați ai sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros sau la temperatura camerei. Sedimentul preparat îmbogățit cu substanța chimică de testare trebuie utilizat imediat în cadrul testului. Probele de sediment îmbogățit pot fi depozitate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță chimică de testare.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germania. pp. 107-119.

## ▼ M6

## Apendicele 5

**Metode de creștere a *Lumbriculus variegatus***

*Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), *Lumbriculidae*, Oligochete trăiește în sedimentele de apă dulce și este utilizat pe scară largă în testele ecotoxicologice. Acesta poate fi crescut cu ușurință în condiții de laborator. O descriere generală a metodelor de creștere este furnizată mai jos.

**Metode de creștere**

Condițiile de creștere a *Lumbriculus variegatus* sunt prezentate în detaliu în Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Un rezumat al acestor condiții este prezentat în continuare. Un avantaj important al *L. variegatus* este reproducerea sa rapidă, având ca rezultat o creștere rapidă a biomasei în rândul populațiilor crescute în laborator [de exemplu, (1), (3), (4), (5)].

Viermii pot fi crescuți în acvarii de mari dimensiuni (57 – 80 l) la o temperatură de 23 °C cu o perioadă de expunere de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric (100 – 1 000 lx) utilizând apă naturală reînnoită zilnic (45 – 50 l per acvariu). Substratul este preparat prin decuparea de fâșii din șervete de hârtie maro nealbită care apoi pot fi amestecate cu apa de cultură timp de câteva secunde pentru a obține mici bucăți de substrat de hârtie. Acest substrat poate fi apoi utilizat pentru a acoperi fundul rezervorului acvariului de cultură de *Lumbriculus* sau poate fi depozitat congelat în apă deionizată în vederea unei utilizări ulterioare. Noul substrat din rezervor va putea fi utilizat în general aproximativ două luni.

Fiecare cultură de viermi începe cu 500-1 000 de viermi care sunt hrăniți printr-o suspensie de 10 ml conținând 6 g de hrană de cultură de pornire pentru păstrăvi, de 3 ori pe săptămână, în condiții de reînnoire sau dinamice. În cazul culturilor statice sau semistatice vitezele de hrănire trebuie reduse pentru a preveni dezvoltarea de bacterii și de ciuperci.

În aceste condiții, numărul de exemplare din cultură se dublează în general în aproximativ 10-14 zile.

Alternativ, *Lumbriculus variegatus* poate fi crescut într-un sistem alcătuit dintr-un strat de nisip cuarțos ca cel utilizat pentru sedimentul artificial (1-2 cm adâncime) și din apă reconstituită. Se pot utiliza ca vase de cultură și recipiente din sticlă sau din oțel inoxidabil cu înălțimea cuprinsă între 12 și 20 cm. Întreaga cantitate de apă trebuie ușor aerată (de exemplu, 2 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului. Pentru a evita orice fel de acumulare, de exemplu de amoniac, apa acoperitoare trebuie schimbată utilizând un sistem în regim dinamic sau manual, cel puțin o dată pe săptămână. Oligochetele pot fi crescute la temperatura camerei cu o fotoperioadă de 16 ore de lumină (intensitate de 100 – 1 000 lx) și de 8 ore de întuneric. În cazul culturii semistatice (reînnoirea apei o dată pe săptămână), viermii sunt hrăniți cu TetraMin de două ori pe săptămână (de exemplu, 0,6 – 0,8 mg pe cm<sup>2</sup> de suprafață de sediment), care poate fi furnizat sub formă de suspensie de 50 mg de TetraMin pe ml de apă deionizată.

*Lumbriculus variegatus* poate fi extras din culturi, de exemplu, prin transferul într-un pahar de laborator separat a substratului cu ajutorul unei plase cu ochiuri fine sau prin transferul organismelor cu ajutorul unei pipete din sticlă cu gura largă (cu diametrul de aproximativ 5 mm) finisată la foc. În cazul în care substratul este transferat în același timp în respectivul pahar de laborator, recipientul care conține viermii și substratul este lăsat peste noapte în condiții dinamice, care vor permite eliminarea substratului din recipient, viermii rămânând pe fundul vasului. Aceștia pot fi apoi introduși în rezervoarele de cultură nou pregătite sau pregătiți ulteriori pentru test conform descrierii din referințele (3) și (4) sau de la punctele de mai jos.

Atunci când se utilizează *L. variegatus* în cadrul testelor asupra sedimentului trebuie acordată atenție modului său de reproducere [arhitomie sau morfalexă, de exemplu (6)]. Acest mod de reproducere asexuată are ca rezultat două fragmente, care nu se hrănesc o anumită perioadă până ce segmentul capului sau al cozii se regenerează [de exemplu, (7), (8)]. Acest lucru semnifică faptul că expunerea *L. variegatus* prin ingestia de sediment contaminat nu este un proces continuu.

▼ **M6**

Prin urmare, trebuie realizată o sincronizare pentru reducerea la minimum a reproducerii și a regenerării necontrolate care determină o variație ridicată a rezultatelor testului. O astfel de variație poate apărea atunci când unele exemplare, care sunt fragmentate și care, în consecință, nu se hrănesc pentru o anumită perioadă, sunt expuse mai puțin la substanța chimică de testare decât alte exemplare care nu se fragmentează pe parcursul testului (9), (10), (11). Cu 10-14 zile înainte de expunere, viermii trebuie să fie fragmentați în mod artificial (sincronizare). Trebuie selectați pentru sincronizare viermi (adulți) de mari dimensiuni care, de preferință, nu prezintă niciun semn de morfalaxă recentă. Acești viermi pot fi așezați pe o lamelă din sticlă într-o picătură de apă de cultură și disecați cu ajutorul unui bisturiu în regiunea mediană a corpului. Trebuie avut grijă ca extremitățile posterioare să fie de dimensiuni similare. Extremitățile posterioare trebuie apoi lăsate să regenereze capete noi într-un vas de cultură care să conțină același substrat ca cel utilizat în cultură și apă reconstituită, până la începerea perioadei de expunere. Regenerarea de capete noi este indicată în momentul introducerii viermilor sincronizați în substrat (prezența capetelor regenerare poate fi confirmată prin examinarea la un microscop binocular a unui subșantion reprezentativ. Organismele de testare sunt examinate ulterior pentru a se constata dacă se găsesc într-o stare fiziologică similară. Acest lucru înseamnă că, atunci când are loc reproducerea prin morfalaxă în cazul viermilor sincronizați pe parcursul testului, se estimează că practic toate animalele sunt expuse în aceeași măsură la sedimentul îmbogățit. Hrănirea viermilor sincronizați trebuie să se realizeze imediat ce viermii încep să pătrundă în substrat sau după 7 zile de la disecție. Regimul de hrănire trebuie să fie comparabil cu cel al culturilor normale, însă se recomandă hrănirea viermilor sincronizați cu aceeași sursă de hrană ca cea utilizată în cadrul testului. Viermii trebuie ținuti la o temperatură de testare, la  $20 \pm 2$  °C. După regenerare, trebuie utilizați pentru test viermii întregi și intacti care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui stimul mecanic ușor. A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor scobitori din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

**Surse de culturi de pornire pentru *Lumbriculus variegatus* [adrese din SUA extrase din referința (4)]**

**Europa**

ECT Oekotoxikologie GmbH  
Böttgerstr. 2-14  
D-65439 Flörsheim/Main  
Germania

Bayer Crop Science AG  
Development – Ecotoxicology  
Alfred-Nobel-Str. 50  
D-40789 Monheim  
Germania

University of Joensuu  
Laboratory of Aquatic Toxicology  
Dept. of Biology  
Yliopistokatu 7, P.O. Casetta 111  
FIN-80101 Joensuu  
Finlanda

Dresden University of Technology  
Institut für Hydrobiologie  
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydro-  
wissenschaften  
Mommsenstr. 13  
D-01062 Dresden  
Germania

C.N.R.- I.R.S.A.  
Italian National Research Council  
Water Research Institute  
Via Mornera 25  
I-20047 Brugherio MI

**S.U.A.**

U.S. Environmental Protection Agency  
Mid-Continent Ecological Division  
6201 Congdon Boulevard  
Duluth, MN 55804

Michigan State University  
Department of Fisheries and Wildlife  
No. 13 Natural Resources Building  
East Lansing, MI 48824-1222

▼ **M6**

|  |  |
|--|--|
| U.S. Environmental Protection Agency<br>Environmental Monitoring System<br>Laboratory<br>26 W. Martin Luther Dr.<br>Cincinnati, OH 45244 | Wright State University<br>Institute for Environmental Quality<br>Dayton, OH 45435 |
|--|--|

|   |  |
|---|--|
| Columbia Environmental Research Center<br>U.S. Geological Survey<br>4200 New Haven Road<br>Columbia, MO 65201 | Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA<br>2205 Commonwealth Boulevard<br>Ann Arbor, MI 48105-1593 |
|---|--|

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. și Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Toxicol. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. În ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. A doua ediție. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. și Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Toxicol. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Toxicol. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Toxicol. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Toxicol. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

▼ **M6***Apendicele 6***Rezumatul rezultatelor ring testului****„Test de toxicitate asupra sedimentului cu *Lumbriculus variegatus*”***Tabelul 1*

**Rezultatele ciclurilor individuale ale ring testului: numărul mediu de viermi din vasele de control și din vasele de control cu solvent la finalul testului; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.**

|                                | numărul mediu de viermi din vasele de control | SD    | CV (%)       | n | numărul mediu de viermi din vasele de control cu solvent | SD   | CV (%)       | n |
|--------------------------------|---|-------|--------------|---|--|------|--------------|---|
|                                | <b>32,3</b>                                   | 7,37  | 22,80        | 3 | <b>39,0</b>  | 3,61 | 9,25         | 3 |
|                                | <b>40,8</b>                                   | 6,55  | 16,05        | 6 | <b>36,0</b>  | 5,29 | 14,70        | 3 |
|                                | <b>41,5</b>                                   | 3,54  | 8,52         | 2 | <b>38,5</b>  | 7,05 | 18,31        | 4 |
|                                | <b>16,3</b>                                   | 5,99  | 36,67        | 6 | <b>30,8</b>  | 6,70 | 21,80        | 4 |
|                                | <b>24,3</b>                                   | 10,69 | 43,94        | 3 | <b>26,3</b>  | 3,06 | 11,60        | 3 |
|                                | <b>28,5</b>                                   | 8,29  | 29,08        | 4 | <b>30,7</b>  | 1,15 | 3,77         | 3 |
|                                | <b>28,3</b>                                   | 3,72  | 13,14        | 6 | <b>28,8</b>  | 2,56 | 8,89         | 6 |
|                                | <b>25,3</b>                                   | 5,51  | 21,74        | 3 | <b>27,7</b>  | 1,53 | 5,52         | 3 |
|                                | <b>23,8</b>                                   | 2,99  | 12,57        | 4 | <b>21,3</b>  | 1,71 | 8,04         | 4 |
|                                | <b>36,8</b>                                   | 8,80  | 23,88        | 6 | <b>35,0</b>  | 4,20 | 11,99        | 6 |
|                                | <b>33,0</b>                                   | 3,58  | 10,84        | 6 | <b>33,5</b>  | 1,73 | 5,17         | 4 |
|                                | <b>20,7</b>                                   | 2,73  | 13,22        | 6 | <b>15,0</b>  | 6,68 | 44,56        | 4 |
|                                | <b>42,0</b>                                   | 7,07  | 16,84        | 6 | <b>43,7</b>  | 0,58 | 1,32         | 3 |
|                                | <b>18,2</b>                                   | 3,60  | 19,82        | 6 | <b>21,7</b>  | 4,04 | 18,65        | 3 |
|                                | <b>32,0</b>                                   | 3,95  | 12,34        | 6 | <b>31,3</b>  | 4,79 | 15,32        | 4 |
| <b>media interlabo-ratoare</b> | <b>29,59</b>                                  |       | <b>20,10</b> |   | <b>30,61</b>   |      | <b>13,26</b> |   |
| <b>SD</b>                      | <b>8,32</b>                                   |       | <b>10,03</b> |   | <b>7,57</b>  |      | <b>10,48</b> |   |
| <b>n</b>                       | <b>15</b>                                     |       |              |   | <b>15</b>  |      |              |   |
| <b>min</b>                     | <b>16,3</b>                                   |       |              |   | <b>15,0</b>  |      |              |   |
| <b>max</b>                     | <b>42,0</b>                                   |       |              |   | <b>43,7</b>  |      |              |   |
| <b>CV (%)</b>                  | <b>28,1</b>                                   |       |              |   | <b>24,7</b>  |      |              |   |



▼ **M6**

Tabelul 2

**Rezultatele ciclurilor individuale ale ring testului: greutatea uscată medie totală a viermilor per probă duplicat în vasele de control și în vasele de control cu solvent la finalul testului; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.**

|                                | greutatea uscată totală a viermilor per probă duplicat (vase de control) | SD   | CV (%)       | n | greutatea uscată totală a viermilor per probă duplicat (vase de control cu solvent) | SD    | CV (%)       | n |
|--------------------------------|--|------|--------------|---|---|-------|--------------|---|
|                                | <b>24,72</b>   | 6,31 | 25,51        | 3 | 27,35   | 4,08  | 14,93        | 3 |
|                                | <b>30,17</b>   | 2,04 | 6,75         | 6 | 33,83   | 10,40 | 30,73        | 3 |
|                                | <b>23,65</b>   | 3,61 | 15,25        | 2 | 28,78   | 4,68  | 16,28        | 4 |
|                                | <b>12,92</b>   | 6,83 | 52,91        | 6 | 24,90   | 6,84  | 27,47        | 4 |
|                                | <b>21,31</b>   | 4,17 | 19,57        | 3 | 25,87   | 5,30  | 20,49        | 3 |
|                                | <b>22,99</b>   | 4,86 | 21,16        | 4 | 24,64   | 5,09  | 20,67        | 3 |
|                                | <b>18,91</b>   | 1,91 | 10,09        | 6 | 19,89   | 1,77  | 8,89         | 6 |
|                                | <b>24,13</b>   | 1,63 | 6,75         | 3 | 25,83   | 2,17  | 8,41         | 3 |
|                                | <b>22,15</b>   | 3,18 | 14,34        | 4 | 22,80   | 2,60  | 11,40        | 4 |
|                                | <b>35,20</b>   | 8,12 | 23,07        | 6 | 31,42   | 8,45  | 26,90        | 6 |
|                                | <b>41,28</b>   | 5,79 | 14,02        | 6 | 41,42   | 4,37  | 10,55        | 4 |
|                                | <b>15,17</b>   | 5,78 | 38,09        | 6 | 10,50   | 3,42  | 32,53        | 4 |
|                                | <b>35,69</b>   | 8,55 | 23,94        | 6 | 38,22   | 1,23  | 3,21         | 3 |
|                                | <b>19,57</b>   | 5,21 | 26,65        | 6 | 28,58   | 6,23  | 21,81        | 3 |
|                                | <b>29,40</b>   | 2,16 | 7,34         | 6 | 31,15   | 2,70  | 8,67         | 4 |
| <b>media interlabo-ratoare</b> | <b>25,15</b>   |      | <b>20,36</b> |   | <b>27,68</b>  |       | <b>17,53</b> |   |
| <b>SD</b>                      | <b>7,87</b>  |      | <b>12,56</b> |   | <b>7,41</b>   |       | <b>9,10</b>  |   |
| <b>n</b>                       | <b>15</b>  |      |              |   | <b>15</b>   |       |              |   |
| <b>min</b>                     | <b>12,9</b>  |      |              |   | <b>10,5</b>   |       |              |   |
| <b>max</b>                     | <b>41,3</b>  |      |              |   | <b>41,4</b>   |       |              |   |
| <b>CV (%)</b>                  | <b>31,3</b>  |      |              |   | <b>26,8</b>   |       |              |   |

▼ **M6**

Tabelul 3

**Toxicitatea PCP: Rezumatul punctelor finale în cadrul ring testului; mediile interlaboratoare pentru EC<sub>50</sub>, NOEC și LOEC; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.**

| parametru biologic  |                        | media interlaboratoare (mg/kg) | min. | max. | factor interlaboratoare | SD   | CV (%) | media geometrică (mg/kg) |
|---|------------------------|--------------------------------|------|------|-------------------------|------|--------|--------------------------|
| <b>numărul total de viermi</b>  | <b>EC<sub>50</sub></b> | <b>23,0</b>                    | 4,0  | 37,9 | 9,4                     | 10,7 | 46,3   | 19,9                     |
|   | <b>NOEC</b>            | <b>9,9</b>                     | 2,1  | 22,7 | 10,7                    | 7,2  | 72,3   | 7,6                      |
|   | <b>LOEC</b>            | <b>27,9</b>                    | 4,7  | 66,7 | 14,2                    | 19,4 | 69,4   | 20,9                     |
|   | <b>MDD (%)</b>         | <b>22,5</b>                    | 7,1  | 39,1 |                         |      |        |                          |
| <b>greutatea uscată totală a viermilor</b>                            | <b>EC<sub>50</sub></b> | <b>20,4</b>                    | 7,3  | 39,9 | 5,5                     | 9,1  | 44,5   | 18,2                     |
|   | <b>NOEC</b>            | <b>9,3</b>                     | 2,1  | 20,0 | 9,4                     | 6,6  | 70,4   | 7,4                      |
|   | <b>LOEC</b>            | <b>25,7</b>                    | 2,1  | 50,0 | 23,5                    | 16,8 | 65,5   | 19,4                     |
|   | <b>MDD (%)</b>         | <b>24,8</b>                    | 10,9 | 44,7 |                         |      |        |                          |
| <b>mortalitate/supraviețuire</b>                                      | <b>LC<sub>50</sub></b> | <b>25,3</b>                    | 6,5  | 37,2 | 5,7                     | 9,4  | 37,4   | 23,1                     |
|   | <b>NOEC</b>            | <b>16,5</b>                    | 2,1  | 40,0 | 18,8                    | 10,3 | 62,4   | 12,8                     |
|   | <b>LOEC</b>            | <b>39,1</b>                    | 4,7  | 66,7 | 14,2                    | 18,1 | 46,2   | 32,6                     |
| <b>reproducere (creșterea numărului de viermi per probă duplicat)</b> | <b>EC<sub>50</sub></b> | <b>20,0</b>                    | 6,7  | 28,9 | 4,3                     | 7,6  | 37,9   | 18,3                     |
|   | <b>NOEC</b>            | <b>7,9</b>                     | 2,1  | 20,0 | 9,4                     | 5,2  | 66,0   | 6,4                      |
|   | <b>LOEC</b>            | <b>22,5</b>                    | 2,1  | 50,0 | 23,5                    | 15,4 | 68,6   | 16,0                     |
|   | <b>MDD (%)</b>         | <b>29,7</b>                    | 13,9 | 47,9 |                         |      |        |                          |
| <b>creștere (creșterea biomasei per probă duplicat)</b>               | <b>EC<sub>50</sub></b> | <b>15,3</b>                    | 5,7  | 29,9 | 5,2                     | 7,1  | 46,5   | 13,7                     |
|   | <b>NOEC</b>            | <b>8,7</b>                     | 2,1  | 20,0 | 9,4                     | 6,0  | 68,1   | 6,9                      |
|   | <b>LOEC</b>            | <b>24,0</b>                    | 2,1  | 50,0 | 23,5                    | 15,7 | 65,5   | 17,3                     |
|   | <b>MDD (%)</b>         | <b>32,2</b>                    | 13,6 | 65,2 |                         |      |        |                          |

MDD: diferența detectabilă minimă în raport cu valorile probelor de control pe parcursul testării ipotezei; utilizată ca o măsură a puterii statistice

## BIBLIOGRAFIE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

## ▼ M6

C.36. TEST DE REPRODUCERE A UNUI ACARIAN PRĂDĂTOR  
[*HYPOASPIS (GEOLAEAPS) ACULEIFER*] DIN SOL

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 226 (2008). Prezenta metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele substanțelor chimice din sol asupra ratei de reproducere a unei specii de acarian din sol, *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), permițând astfel estimarea inhibiției ritmului de creștere specific al unei populații (1,2). În acest caz, capacitatea de reproducere semnifică numărul de exemplare tinere la finalul perioadei de testare. *H. aculeifer* reprezintă un nivel trofic suplimentar față de speciile pentru care sunt deja disponibile metode de testare. În scopul prezentei metode de testare, un test de reproducere fără discriminare și cuantificare a diferitelor stadii ale ciclului de reproducere este considerat adecvat. Pentru substanțele chimice al căror mod de expunere nu implică solul, ar putea fi adecvate alte abordări (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* este considerat un reprezentant relevant al faunei din sol și, în special, al acarienilor prădători. Acesta este răspândit în toată lumea (5) și poate fi colectat și înmulțit cu ușurință în laborator. Un rezumat al biologiei speciei de *H. aculeifer* este prezentat în apendicele 7. Informații de referință privind ecologia speciilor de acarieni și utilizarea acestora în cadrul testelor ecotoxicologice sunt disponibile în referințele (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

## PRINCIPIUL TESTULUI

3. Femelele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare amestecate în sol. La începutul testului, în fiecare vas duplicat sunt introduse câte 10 femele adulte. Masculii nu sunt incluși în test deoarece experiența a demonstrat că femelele se împerechează imediat sau la scurt timp după ecloziune în stadiul de deutonimfă, în cazul în care masculii sunt prezenți. În plus, includerea masculilor ar prelungi durata testului întrucât ar fi necesară o diferențiere laborioasă a stadiilor de dezvoltare. În consecință, împerecherea în sine nu constituie parte a testului. Femelele sunt incluse în test după 28-35 de zile de la începerea perioadei de pontă în cadrul procesului de sincronizare (a se vedea apendicele 4), deoarece se poate considera în acest caz că femelele deja s-au împerecheat și au trecut în etapa anterioară a pontei ovulare. La o temperatură de 20 °C, testul se încheie în cea de a 14-a zi după includerea femelelor (ziua 0), ceea ce permite primilor descendenți din grupurile de control să atingă stadiul de deutonimfă (a se vedea apendicele 4). Pentru calcularea principalelor variabile măsurate, se stabilește numărul de exemplare tinere pentru fiecare vas de testare, precum și numărul de femele supraviețuitoare. Rata de reproducere a acarienilor expuși la substanța chimică de testare este comparată cu cea a acarienilor din grupurile de control pentru a determina  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) sau concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) (pentru definiții, a se vedea apendicele 1), în funcție de proiectul experimentului (a se vedea punctul 29). O prezentare generală a calendarului testelor este inclusă în apendicele 8.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

4. Ar fi de preferat să se cunoască solubilitatea în apă,  $\log K_{ow}$ , coeficientul de partiție sol/apă și presiunea de vapori a substanței de testare. Sunt de dorit informații suplimentare privind evoluția substanței chimice de testare în sol, precum viteza de degradare biotică și abiotică.
5. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței de testare va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție sol/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

**▼ M6****VALIDITATEA TESTULUI**

6. Pentru ca un rezultat să fie considerat valabil, grupurile de control netratate trebuie să îndeplinească următoarele criterii:
  - Rata medie a mortalității în rândul femelelor adulte nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului;
  - Numărul mediu de exemplare tinere per vas duplicat (cu 10 femele adulte incluse) trebuie să fie de cel puțin 50 la finalul testului;
  - Coeficientul de variație calculat pentru numărul de exemplare tinere de acarieni per vas duplicat nu trebuie să fie mai mare de 30 % la încheierea testului final.

**SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ**

7. Trebuie determinată valoarea EC<sub>x</sub> și/sau NOEC a unei substanțe chimice de referință pentru a garanta caracterul adecvat al condițiilor de testare din laborator și pentru a verifica regularitatea răspunsului organismelor de testare în timp. Dimetoatul (CAS 60-51-5) este o substanță chimică de referință corespunzătoare care și-a demonstrat efectul asupra dimensiunii populației (4). Acidul boric (CAS 10043-35-3) poate fi utilizat ca o substanță chimică de referință alternativă. Experiența dobândită în cazul acestei substanțe chimice este limitată. Sunt posibile două opțiuni conceptuale:
  - Substanța chimică de referință poate fi testată în paralel cu determinarea toxicității fiecărei substanțe de testare la o concentrație demonstrată în prealabil în cadrul unui studiu doză-răspuns pentru a provoca o reducere > 50 % a numărului descendenților. În acest caz, numărul probelor duplicat trebuie să fie același cu cel din vasele de control (a se vedea punctul 29).
  - Alternativ, substanța chimică de referință este testată de 1-2 ori pe an în cadrul unui test doză-răspuns. În funcție de modelul ales, numărul de concentrații și de probe duplicat și factorul de separare variază (a se vedea punctul 29), însă trebuie obținut un răspuns echivalent cu 10-90 % din efect (factor de separare de 1,8). Valoarea EC<sub>50</sub> a dimetoatului calculată pe baza numărului de exemplare tinere trebuie să se încadreze în intervalul cuprins între 3,0 și 7,0 mg a.s./kg de sol (greutate uscată). Pe baza rezultatelor obținute până în prezent cu acidul boric, valoarea EC<sub>50</sub> bazată pe numărul de exemplare tinere trebuie să se încadreze în intervalul cuprins între 100 și 500 mg/kg greutate uscată a solului.

**DESCRIEREA TESTULUI****Vase și echipamentele de testare**

8. Trebuie utilizate vase de testare cu diametrul de 3-5 cm (înălțimea solului ≥ 1,5 cm), din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert și prevăzute cu un capac corespunzător. A se utiliza de preferință capace cu filet și, în acest caz, vasele ar putea fi aerate de două ori pe săptămână. Alternativ, pot fi utilizate capace care permit un schimb direct de gaze între substrat și atmosferă (de exemplu, tifon). Întrucât gradul de umiditate trebuie să rămână suficient de mare pe parcursul testului, este esențial să se verifice greutatea fiecărui vas de control pe parcursul testului și să se adauge apă dacă este necesar. Acest lucru este important în special în cazul în care nu sunt disponibile capace cu filet. În cazul în care este utilizat un vas de testare opac, capacul trebuie să fie dintr-un material care să permită accesul luminii (de exemplu, printr-un capac transparent perforat) împiedicându-i în același timp pe acarieni să scape. Dimensiunea și tipul vasului de testare depinde de metoda de extracție (pentru detalii, a se vedea appendicele 5). În cazul aplicării unei extracții la căldură direct pe vasul de testare, ar putea fi adăugată pe fundul vasului o plasă cu ochiuri de dimensiuni corespunzătoare (sigilată până în momentul extracției), iar adâncimea solului trebuie să fie suficientă pentru a permite stabilirea unui gradient de temperatură și de umiditate.

**▼ M6**

9. Sunt necesare echipamente de laborator standard, care să includă, în special, următoarele:

- vase, de preferință din sticlă cu capace cu filet;
- dulap pentru uscare;
- stereomicroscop;
- pensule pentru transferul acarienilor
- pH-metru și luxmetru;
- cântare de precizie adecvate;
- echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;
- echipamente adecvate pentru controlul umidității aerului (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt acoperite cu capace);
- incubator sau o cameră mică cu temperatură controlată;
- echipamente de extracție (a se vedea apendicele 5) (13)
- panou luminos suspendat cu sistem de control al luminii
- borcane de colectare pentru acarienii extrași.

**Pregătirea solului artificial**

10. Pentru prezentul test, se utilizează un sol artificial. Solul artificial include următoarele componente (toate valorile se bazează pe masa uscată):

- 5 % mușchi de turbă, uscat cu aer și fin măcinat (se acceptă o dimensiune a particulelor de  $2 \pm 1$  mm);
- 20 % argilă caolinică (de preferință, conținut caolinit de peste 30 %);
- aproximativ 74 % de nisip industrial uscat cu aer (în funcție de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni. Cantitatea exactă de nisip depinde de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  (a se vedea mai jos), proporția combinată a celor două componente trebuie să atingă 75 %.
- < 1,0 % carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, puritate analitică) pentru a obține un pH de  $6,0 \pm 0,5$ ; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei (a se vedea Nota 1).

*Nota 1:* Cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară va depinde de componentele substratului de sol și trebuie determinată prin măsurarea pH-ului subșanțioanelor de sol chiar înainte de test (14).

*Nota 2:* Conținutul de turbă din solul artificial diferă de cea recomandată în cadrul altor metode de testare a organismelor din sol pentru care se utilizează în cele mai multe cazuri un procent de 10 % turbă [de exemplu (15)]. Cu toate acestea, conform OEPP (16), un sol agricol tipic nu conține mai mult de 5 % materie organică, iar diminuarea conținutului de turbă reflectă astfel posibilitățile reduse ale unui sol natural de sorbție a substanței chimice de testare în raport cu carbonul organic.

*Nota 3:* Dacă este necesar, de exemplu în scopul unei testări specifice, solurile naturale provenite din locuri nepolluate pot servi, de asemenea, ca substrat de testare și/sau de cultură. Cu toate acestea, în cazul în care se utilizează sol natural, acesta trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea (locul colectării), pH-ul și textura sa (distribuția dimensiunii particulelor) și conținutul său de materie organică. Dacă sunt disponibile, trebuie incluse tipul și denumirea solului conform clasificării solurilor, iar solul nu trebuie

▼ **M6**

să fie contaminat. În cazul în care substanța chimică de testare este un metal sau un compus organometalic, trebuie determinată, de asemenea, capacitatea de schimb cationic (CEC) a solului natural. Trebuie acordată o atenție specială respectării criteriilor de validitate întrucât informațiile de referință privind solurile naturale sunt în general rare.

11. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare). Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și de soluție de clorură de potasiu 1 M (KCl) sau de clorură de calciu 0,01 M ( $\text{CaCl}_2$ ) într-un raport de 1:5 [a se vedea referința (14) și apendicele 3]. Dacă aciditatea solului este mai mare decât limita impusă (a se vedea punctul 10), aceasta poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de  $\text{CaCO}_3$ . Dacă solul este prea alcalin, acest lucru poate fi ajustat prin adăugarea unei cantități suplimentare din amestecul care conține primele trei componente descrise la punctul 10, cu excepția  $\text{CaCO}_3$ .
12. Capacitatea maximă de retenție a apei (WHC) a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 2. Cu două-șapte zile înainte de începerea testului, solul artificial uscat este umezit în prealabil prin adăugarea unei cantități suficiente de apă distilată sau deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, adică 40-60 % din WHC maximă. Gradul de umiditate este ajustat la 40-60 % din WHC maximă prin adăugarea soluției de substanță de testare și/sau prin adăugarea de apă distilată sau deionizată (a se vedea punctele 16-18). Se poate realiza o verificare suplimentară aproximativă a gradului de umiditate din sol strângând ușor solul în mână; în cazul în care gradul de umiditate este cel corect, trebuie să apară între degete picături mici de apă.
13. Gradul de umiditate din sol este determinat, la începutul și la finalul testului, prin uscare la o temperatură de 105 °C până la obținerea unei greutate constante în conformitate cu standardul ISO 11465 (17) și a unui pH al solului în conformitate cu anexa 3 sau cu standardul ISO 10390 (14). Aceste măsurători trebuie efectuate pe probe suplimentare fără acarieni, atât pentru solul de control, cât și pentru solul cu fiecare concentrație de testare. pH-ul solului nu trebuie ajustat atunci când sunt testați acizi sau baze. Gradul de umiditate trebuie să fie monitorizat pe întreaga perioadă a testului prin cântărirea periodică a vaselor (a se vedea punctele 20 și 24).

#### **Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare**

14. Specia utilizată în cadrul testului este *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Pentru începerea testului, sunt necesare femele adulte de acarieni, prelevate dintr-un grup sincronizat. Acarienii trebuie incluși după aproximativ 7-14 zile de la trecerea la stadiul de adult, după 28-35 de zile de la începerea perioadei de pontă în cadrul procesului de sincronizare (a se vedea punctul 3 și apendicele 4). Trebuie să se înregistreze sursa acarienilor sau furnizorul acestora și întreținerea culturii de laborator. În cazul în care este menținută o cultură de laborator, se recomandă ca identitatea speciilor să fie confirmată cel puțin o dată pe an. O fișă de identificare este inclusă în anexa 6.

#### **Pregătirea concentrațiilor de testare**

15. Substanța de testare este amestecată în sol. Solvenții organici utilizați pentru facilitarea tratamentului solului cu substanța chimică de testare trebuie selectați pe baza toxicității lor scăzute pentru acarieni și trebuie inclus în proiectul de testare un vas de control cu solvent (a se vedea punctul 29).

#### *Substanța chimică de testare solubilă în apă*

16. O soluție a substanței de testare este pregătită în apă deionizată într-o cantitate suficientă pentru toate duplicatele cu o concentrație de testare. Se recomandă utilizarea unei cantități corespunzătoare de apă pentru a obține gradul de umiditate necesar, și anume 40-60 % din WHC maximă (a se vedea punctul 12). Fiecare soluție a substanței de testare se amestecă bine cu o probă de sol umezit în prealabil înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

▼ **M6***Substanța chimică de testare insolubilă în apă*

17. În cazul substanțelor chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică de testare poate fi dizolvată în cel mai mic volum posibil al unui dizolvent adecvat (de exemplu, acetonă). Trebuie utilizați numai solvenți volatili. În cazul în care sunt utilizați astfel de dizolvanți, toate concentrațiile de testare și vasul de control trebuie să conțină aceeași cantitate minimă de dizolvent. Dizolventul este pulverizat sau amestecat cu o cantitate redusă, de exemplu 10 g, de nisip cuarțos. Conținutul total de nisip din substrat trebuie corectat în funcție de această cantitate. Dizolventul este eliminat prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin o oră. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul umezit în prealabil și se amestecă bine adăugând o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține umiditatea dorită. Amestecul final este introdus în vasele de testare. A se avea în vedere faptul că anumiți solvenți pot fi toxici pentru acarienii. Prin urmare, se recomandă utilizarea unui vas de control suplimentar cu apă fără dizolvent, în cazul în care nu se cunoaște toxicitatea solventului pentru acarienii. În cazul în care se demonstrează în mod corespunzător că solventul (în concentrațiile care trebuie aplicate) nu are niciun efect, vasul de control cu apă poate fi exclus.

*Substanță chimică puțin solubilă în apă și solvenți organici*

18. În cazul substanțelor chimice puțin solubile în apă și solvenți organici, echivalentul de 2,5 g de nisip cuarțos fin măcinat pentru fiecare vas de testare (de exemplu, 10 g de nisip cuarțos fin pentru patru duplicate) este amestecat cu cantitatea de substanță chimică pentru a obține concentrația de testare dorită. Conținutul total de nisip din substrat trebuie corectat în funcție de această cantitate. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul umezit în prealabil și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține gradul de umiditate dorit. Amestecul final este distribuit în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, un vas de control corespunzător.

**PROCEDURA****Grupuri de testare și vase de control**

19. Pentru fiecare vas de control și de tratament, se recomandă utilizarea a zece femele adulte în 20 g de masă de sol artificial. Organismele de testare trebuie adăugate într-un interval de două ore după pregătirea substratului de testare final (și anume, după aplicarea substanței de testare). În anumite cazuri (de exemplu, atunci când îmbătrânirea este considerată un factor determinant), intervalul de timp între pregătirea substratului de testare final și adăugarea acarienilor trebuie prelungit [pentru detalii privind îmbătrânirea, a se vedea referința (18)]. Cu toate acestea, în astfel de cazuri, trebuie furnizată o justificare științifică.
20. După adăugarea acarienilor în sol, aceștia sunt hrăniți, iar greutatea inițială a fiecărui vas de testare trebuie măsurată pentru a fi utilizată ca referință pentru monitorizarea gradului de umiditate a solului pe tot parcursul testului, conform descrierii de la punctul 24. Vasele de testare sunt apoi acoperite conform descrierii de la punctul (8) și așezate în camera de testare.
21. Sunt pregătite vase de control corespunzătoare pentru fiecare dintre metodele de aplicare a substanței chimice de testare descrise la punctele 15-18. Sunt urmate procedurile relevante descrise pentru pregătirea vaselor de control, fără a se adăuga substanța chimică de testare. Astfel, dacă este cazul, se adaugă în vasele de control solvenți organici, nisip cuarțos sau alți dizolvanți în concentrații/cantități echivalente cu cele din vasele de tratament. Atunci când se utilizează un solvent sau un alt dizolvent pentru a adăuga substanța chimică de testare, trebuie pregătit și testat, de asemenea, un vas de control fără dizolvent sau substanța chimică de testare în cazul în care nu se cunoaște toxicitatea solventului (a se vedea punctul 17).

▼ **M6****Condiții de testare**

22. Temperatura de testare trebuie să fie de  $20 \pm 2$  °C. Temperatura trebuie înregistrată cel puțin zilnic și ajustată, dacă este necesar. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în apropiere de vasele de testare. Din motive de compatibilitate, aceste condiții sunt identice ca și în cazul celorlalte teste ecotoxicologice ale solului [de exemplu, referința (15)].
23. Schimbul de gaze trebuie garantat prin aerarea vaselor de testare de două ori pe săptămână în cazul în care sunt utilizate capace cu filet. În cazul utilizării unor capace din tifon, trebuie acordată o atenție specială menținerii gradului de umiditate a solului (a se vedea punctele 8 și 24).
24. Gradul de umiditate a substratului de sol din vasele de testare este menținut pe tot parcursul testului prin cântărire și, dacă este necesar, prin adăugarea periodică de apă în vasele de testare (de exemplu, o dată pe săptămână). Dacă este necesar, pierderile sunt compensate cu apă deionizată. Gradul de umiditate a solului pe parcursul testului nu trebuie să difere cu mai mult de 10 % din valoarea inițială.

**Hrănirea**

25. S-a demonstrat că acarienii de brânză [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] reprezintă o sursă de hrană adecvată. Pot fi, de asemenea, adecvate colebolele de mici dimensiuni [de exemplu, exemplare tinere de *Folsomia candida* Willem, 1902 sau *Onychiurus fimatus* (19), (20), enchitreide (de exemplu, *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) sau nematode (de exemplu, *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)] (21). Se recomandă verificarea hranei înainte de utilizarea sa în cadrul testului. Tipul și cantitatea de hrană trebuie să asigure obținerea unui număr adecvat de exemplare tinere pentru a îndeplini criteriile de validitate (punctul 6). Pentru selectarea prăzii, trebuie luat în considerare modul de acțiune al substanței de testare (de exemplu, un acaricid poate fi toxic și pentru acarienii utilizați ca hrană; a se vedea punctul 26).
26. Hrana trebuie furnizată *ad libitum* [și anume, de fiecare dată într-o cantitate mică (vârful unei spatule)]. În acest scop, poate fi utilizat și un aspirator cu aspirație ușoară astfel cum este propus în testul asupra colebolelor sau o pensulă de vopsit fină. De obicei, va fi suficientă furnizarea de hrană la începutul testului și de două-trei ori pe săptămână. Atunci când substanța de testare pare a fi toxică pentru pradă, trebuie luată în considerare o creștere a frecvenței hrănirii și/sau o sursă de hrană alternativă.

**Selectarea concentrațiilor de testare**

27. Informațiile anterioare cu privire la toxicitatea substanței chimice de testare, provenite, de exemplu, dintr-o serie de studii de stabilire a intervalului, ar trebui să faciliteze selectarea concentrațiilor de testare adecvate. Dacă este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu cinci concentrații ale substanței chimice de testare cuprinse între 0,1 și 1 000 mg/kg de sol uscat, cu cel puțin o probă duplicat pentru tratamente și pentru vasul de control. Durata testului de stabilire a intervalului este de 14 zile, după care se stabilesc rata mortalității în rândul acarienilor adulți și numărul de exemplare tinere. Intervalul concentrațiilor în cadrul testului final trebuie să fie ales de preferință astfel încât să includă concentrații care să influențeze numărul de exemplare tinere, însă nu și supraviețuirea generației materne. Cu toate acestea, acest lucru nu poate fi posibil în cazul substanțelor chimice care provoacă efecte letale și subletale în concentrații aproximativ similare. Concentrațiile efective (de exemplu, EC<sub>50</sub> EC<sub>25</sub>, EC<sub>10</sub>) și intervalul de concentrații în care efectul substanței de testare prezintă interes trebuie să fie cuprinse în seria concentrațiilor incluse în test. Extrapolarea la valori cu mult sub cea mai scăzută concentrație care afectează organismele de testare sau cu mult peste cea mai mare concentrație testată trebuie realizată numai în cazuri excepționale și trebuie furnizată o explicație completă în raport.

**Proiectul experimentului***Teste doză-răspuns*

28. Sunt propuse trei modele de teste, pe baza recomandărilor formulate în cadrul unui alt ring test [Testul de reproducere a enchitreidelor (22)].



**▼ M6**

Caracterul adecvat general al tuturor acestor modele a fost confirmat de rezultatele validării privind *H. aculeifer*.

29. La stabilirea intervalului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

- Pentru stabilirea valorii  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ), trebuie testate douăsprezece concentrații. Se recomandă cel puțin două probe duplicate pentru fiecare concentrație de testare și șase probe duplicate de control. Factorul de separare poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în gama de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrații mai ridicate sau mai scăzute.
- Pentru stabilirea valorii NOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicate pentru fiecare concentrație de testare și opt vase de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 2,0.
- O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și  $EC_x$ . Trebuie utilizate opt concentrații de tratament într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicate pentru fiecare tratament și opt vase de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

*Test la valori-limită*

30. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg greutate uscată a solului), testul de reproducere final poate fi realizat sub forma unui test la valori-limită utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg greutate uscată a solului. Un test la valori-limită va oferi posibilitatea de a demonstra că NOEC sau  $EC_{10}$  pentru reproducere este mai mare decât concentrația-limită, diminuând în același timp numărul acarienilor utilizați în cadrul testului. Trebuie utilizate opt probe duplicate atât pentru solul tratat, cât și pentru vasul de control.

**Durata testului și măsurători**

31. Trebuie înregistrată orice diferență observată între comportamentul și morfologia acarienilor din vasele de control și cele tratate.
32. În cea de a 14-a zi, acarienii supraviețuitori sunt extrași din sol prin extracție la căldură/lumină sau printr-o altă metodă corespunzătoare (a se vedea apendicele 5). Exemplarele tinere (și anume, larve, protonimfe și deutonomimfe) și adulții sunt numărați separat. Toți acarienii adulți care nu sunt găsiți în acest stadiu sunt înregistrați ca morți, presupunându-se că respectivii acarieni au murit și s-au descompus înainte de evaluare. Eficiența extracției trebuie validată o dată sau de două ori pe an în vasele de control cu numere cunoscute de adulți și de exemplare tinere. Eficiența trebuie să fie mai mare de 90 % în medie combinată pentru toate stadiile de dezvoltare (a se vedea apendicele 5). Numărul de adulți și de exemplare tinere nu este ajustat în funcție de eficiență.

**DATE ȘI RAPORT**

**Interpretarea rezultatelor**

33. Informațiile privind metodele statistice care pot fi utilizate pentru analiza rezultatelor testelor sunt furnizate la punctele 36-41. În plus, trebuie consultat Documentul 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (31).
34. Principalul punct final de testare este rata de reproducere, în acest caz, numărul de exemplare tinere produse per vas de testare duplicate (cu 10 femele adulte incluse). Analiza statistică necesită calcularea mediei aritmetice ( $\bar{X}$ ) și a varianței ( $s^2$ ) pentru rata de reproducere pentru fiecare

**▼ M6**

tratament și pentru fiecare vas de control.  $X$  și  $s^2$  sunt utilizate pentru procedurile ANOVA precum testul  $t$  Student, testul Dunnett sau testul Williams, precum și pentru calcularea intervalelor de încredere la 95 %.

*Notă:* acest punct final principal este echivalent cu rata de reproducere măsurată ca numărul de exemplare tinere supraviețuitoare produse pe parcursul testului împărțit la numărul de femele părinți incluse la începutul testului.

35. Numărul de femele supraviețuitoare din vasele de control netratate reprezintă un criteriu de validitate important și trebuie documentat. Ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne nocive trebuie înregistrate și în raportul final.

**EC<sub>x</sub>:**

36. Valorile EC<sub>x</sub>, inclusiv limitele de încredere de 95 % inferioare și superioare corespunzătoare parametrului descris la punctul 34 se calculează utilizând metodele statistice adecvate (de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Kärber sau simpla interpolare). O valoare EC<sub>x</sub> se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu  $x$  % din media etaloanelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC<sub>50</sub> sau a unei alte valori EC<sub>x</sub>, mediile per tratament ( $X$ ) trebuie supuse unei analize de regresie.

**NOEC/LOEC**

37. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice adecvate (conform Documentului 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”). În general, efectele adverse ale substanței de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la  $p \leq 0,05$ . Exemple sunt furnizate la punctele de mai jos.
38. Distribuția normală a datelor poate fi testată, de exemplu cu ajutorul testului de calitate a ajustării Kolmogorov-Smirnov, al testului raportului interval/deviație standard (testul R/s) sau al testului Shapiro-Wilk (bilateral,  $p \leq 0,05$ ). Pentru testarea omogenității varianței, poate fi utilizat testul Cochran, testul Levene sau testul Bartlett (bilateral,  $p \leq 0,05$ ). În cazul în care sunt îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitatea varianței), se pot efectua o analiză de varianță (ANOVA) unilaterală și teste multicomparative ulterioare. Pot fi utilizate comparații multiple (de exemplu, testul Dunnett) sau teste regresive de stabilire a tendinței (testul Williams în cazul unui raport doză-răspuns monoton) pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ( $p \leq 0,05$ ) între vasele de control și diversele concentrații ale substanței de testare (selectarea testului recomandat conform Documentului 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application”). În caz contrar, trebuie utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform testului de Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

**Test la valori-limită**

39. În cazul în care a fost efectuat un test la valori-limită (compararea probei de control cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), pot fi evaluate răspunsurile metrice prin intermediul testului Student (testul  $t$ ). Se poate utiliza testul  $t$  pentru varianțe (testul  $t$  Welch) sau un test neparametric, precum testul U Mann-Whitney, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe.
40. Pentru determinarea diferențelor semnificative între vasele de control (vasul de control și vasul de control cu solvent), probele duplicat ale fiecărui vas de control pot fi testate conform descrierilor pentru testul la valori-limită. În

**▼ M6**

cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate probele duplicate ale vaselor de control și ale vaselor de control cu solvent pot fi cumulate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu vasul de control cu solvent.

**Raportul de testare**

41. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

— *Substanța chimică testată*

- identitatea substanței chimice de testare, denumirea, lotul și numărul CAS, puritatea;
- proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare [de exemplu,  $\log K_{ow}$ , solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și, de preferință, informații privind evoluția substanței chimice de testare în sol).

— *Organismele de testare*

- identificarea și furnizorul organismelor de testare, descrierea condițiilor de creștere;
- intervalul de vârstă al organismelor de testare.

— *Condițiile de testare*

- descrierea modelului experimental și a procedurii;
- detalii privind pregătirea solului de testare; specificații detaliate în cazul în care se utilizează sol natural (origine, istoric, distribuția dimensiunii particulelor, pH-ul, conținutul de materie organică și, dacă este disponibilă, clasificarea solului)
- capacitatea maximă a solului de retenție a apei;
- o descriere a tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice de testare în sol;
- detalii privind substanțele chimice auxiliare utilizate pentru administrarea substanței chimice de testare;
- dimensiunea vaselor de testare și masa uscată de sol de testare pentru fiecare vas;
- condițiile de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;
- o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;
- pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și pe parcursul testului (probă de control și fiecare tratament)
- o descriere detaliată a metodei de extracție și eficiența extracției.

— *Rezultatele testului*

- numărul de exemplare tinere determinat în fiecare vas de testare la finalul testului;
- numărul de femele adulte și rata mortalității în rândul exemplarelor adulte ( %) din fiecare vas de testare la finalul testului
- o descriere a simptomelor evidente sau schimbările clare de comportament;
- rezultatele obținute cu substanța chimică de testare de referință;
- rezumatul statisticilor ( $EC_x$  și/sau NOEC), inclusiv limitele de încredere de 95 % și o descriere a metodei de calcul;

▼ **M6**

- un grafic al relației concentrație/răspuns;
- abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS – Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. A 2-a ediție În: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). În: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haga, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Ind. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Ind. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994*, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. și Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. În: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.
- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Rømbke, J., Rundgren, S. și Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. În: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. și Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beiträge*, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. și Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr.* N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. și Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environmental Science & Technology* 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. *Natura Jutlandica* 20, 95-122.
- (14) ISO (Organizația Internațională de Standardizare) (1994). Calitatea solului – Determinarea pH-ului, nr. 10390. ISO, Geneva.

▼ **M6**

- (15) Capitolul C.8 din prezenta anexă – Toxicitatea la râme.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. și Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola). Ges.allg. angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Capitolul C.32 din prezenta anexă – Testul de reproducere a enchitreidelor.
- (23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. și Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. și Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. și Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

**▼ M6***Apendicele 1***Definiții**

Următoarele definiții se aplică prezentei metode de testare (în cadrul prezentului test toate concentrațiile cu efecte observate sunt exprimate ca masă a substanței chimice testate raportată la masa uscată a solului de testare):

„**Substanța chimică**” este o substanță sau un amestec.

„**NOEC**” (concentrația la care nu se observă niciun efect) reprezintă concentrația substanței chimice de testare în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul prezentului test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„**LOEC**” (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) reprezintă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare care prezintă un efect semnificativ ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„**EC<sub>x</sub>**” (concentrația efectivă pentru un efect de x %) reprezintă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC<sub>50</sub> reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere.

„**Substanța chimică de testare**” reprezintă orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

▼ **M6***Apendicele 2***Determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei**

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei este considerată a fi una adecvată. Aceasta este descrisă în anexa C din ISO DIS 11268-2 [Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction (23)].

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru îmbibată cu apă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită, uscată la o temperatură de 105 °C până ce atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC(în \% din masa uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat în apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

**▼ M6***Apendicele 3***Determinarea pH-ului solului**

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (16).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M de puritate analitică. Ulterior, suspensia este agitată bine timp de cinci minute și lăsată să se sedimenteze timp de cel puțin 2 ore, însă nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).



## ▼ M6

## Apendicele 4

**Creșterea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, a acarienilor utilizați ca hrană și sincronizarea culturilor****Creșterea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Culturile pot fi menținute în vase din plastic sau în borcane din sticlă umplute cu un amestec din ipsos de Paris și de pulbere de cărbune (9:1). Ipsosul poate fi menținut umed prin adăugarea a câtorva picături de apă distilată sau deionizată, dacă este necesar. Temperaturile de creștere optime sunt cuprinse între  $20 \pm 2$  °C, regimul lumină/întuneric nu este relevant pentru această specie. Prada poate fi constituită din acarienii *Tyrophagus putrescentiae* sau *Caloglyphus* sp. (acarienii utilizați ca hrană trebuie manipulați cu atenție întrucât ar putea provoca alergii la om), însă și nematodele, enchitreidele și colembotele sunt adecvate ca pradă. Sursa lor trebuie înregistrată. Dezvoltarea populației poate începe cu o singură femelă, deoarece masculii se dezvoltă în ouă nefecundate. Generațiile se suprapun într-o mare măsură. O femelă poate trăi cel puțin 100 de zile și poate depune aproximativ 100 de ouă pe parcursul întregii sale durate de viață. Nivelul maxim de pontă ovulară este atins între 10 și 40 de zile (după atingerea stadiului de adult) și se ridică la un număr de  $2,2 \text{ ouă femelă}^{-1} \text{ zi}^{-1}$ . Perioada de dezvoltare de la stadiul de ou la cel de femelă adultă este de aproximativ 20 de zile la o temperatură de 20 °C. Trebuie menținute și tratate mai multe culturi în prealabil.

**Creșterea acarianului *Tyrophagus putrescentiae*:**

Acarienii sunt ținuti într-un vas de sticlă umplut cu drojdie fină de bere uscată, care este introdus într-o găleată din plastic umplută cu soluție de  $\text{KNO}_3$  pentru a împiedica acarienii să scape. Acarienii utilizați pentru hrană sunt așezați deasupra acestui strat de drojdie urcată. Ulterior, cu ajutorul unei spatule, aceștia sunt amestecați atent cu drojdia (care trebuie înlocuită de două ori pe săptămână).

**Sincronizarea culturilor:**

Exemplarele utilizate în cadrul testului trebuie să aibă aceeași vârstă (aproximativ 7 zile după atingerea stadiului de adult). La o temperatură de creștere de 20 °C, sincronizarea se realizează astfel:

Se transferă femelele într-un vas de creștere curat și se adaugă suficientă hrană

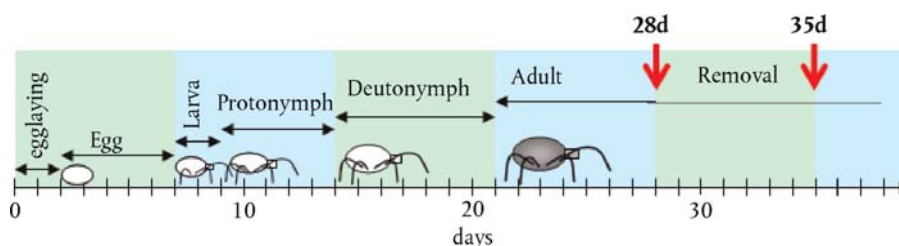
— Se lasă femelele să depună ouă timp de două-trei zile și apoi se scot din vas

— Se prelevează femelele adulte pentru testare între cea de a 28-a și a 35-a zi după introducerea femelelor adulte în vase de creștere curate.

Femelele adulte pot fi ușor diferențiate de masculii și de cele aflate în alte stadii de dezvoltare prin dimensiunea lor mai mare, prin forma umflată și prin scutul dorsal de culoare maro (masculii sunt mai subțiri și plăți), iar acarienii imaturi au o culoare alb-crem. Dezvoltarea acarienilor urmează aproximativ același tipar descris mai jos la o temperatură de 20 °C (figura): ou 5 zile, larvă 2 zile, protonimfă 5 zile, deutonimfă 7 zile, perioada anterioară ponte ovulare a femelei 2 zile. Apoi, acarienii devin adulți.

Figură

**Dezvoltarea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* la o temperatură de 20 °C. (extracție = femele utilizate pentru test)**



**▼ M6**

Animalele adulte pentru testare sunt extrase din cultura sincronizată și introduse în vasele de testare între cea de a 28-a zi și cea de a 35-a zi după începerea perioadei de pontă a femelelor părinți (și anume, 7-14 zile după trecerea la stadiul de adult). Aceasta garantează faptul că animalele pentru testare au trecut deja de perioada anterioară ponte ovulare și s-au împerecheat cu masculii prezenți, de asemenea, în vasul de cultură. Observațiile efectuate pe culturile de laborator sugerează că, dacă masculii sunt prezenți, femelele se împerechează imediat sau la scurt timp după trecerea în stadiul de adult (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). Perioada de șapte zile este aleasă pentru a facilita integrarea în rutina de laborator și pentru a atenua variabilitatea de dezvoltare individuală în rândul acarienilor. Ponta ovulară trebuie inițiată cu un număr de femele cel puțin egal cu cel care va fi în final necesar pentru test (Dacă, de exemplu, sunt necesare 400 de femele în cadrul testului, cel puțin 400 de femele trebuie lăsate să depună ouă timp de două-trei zile. Cel puțin 1 200 de ouă trebuie să reprezinte punctul de pornire pentru populația sincronizată (proporția relativă a sexelor fiind de aproximativ 0,5, rata mortalității, de aproximativ 0,2). Pentru a se evita canibalismul, este de preferat să nu se introducă într-un vas mai mult de 20-30 de femele aflate în perioada de pontă ovulară.

▼ **M6***Apendicele 5***Metode de extracție**

În cazul microartropodelor, o extracție la căldură reprezintă o metodă adecvată pentru separarea exemplarelor de sol/substrat (a se vedea figura de mai jos). Metoda se bazează pe activitatea organismelor, astfel că doar exemplarele mobile vor avea șansa de a fi înregistrate. Principiul extracției la căldură constă în degradarea progresivă a condițiilor pentru organismele din eșantion, astfel încât acestea vor părăsi substratul și vor cădea într-un lichid de fixare (de exemplu, etanol). Punctele esențiale sunt durata extracției și variația condițiilor pentru organisme de la bune la moderate și precare. Durata extracției pentru testele ecotoxice trebuie să fie cât mai scurtă posibil, deoarece orice creștere a populației pe parcursul perioadei de extracție ar vicia rezultatele. Pe de altă parte, condițiile de temperatură și de umiditate din eșantion trebuie să se încadreze întotdeauna într-un interval care să permită deplasarea acarienilor. Încălzirea unui eșantion de sol conduce la o deshidratare a substratului. Dacă deshidratarea este prea rapidă, anumiți acarieni ar putea să se deshidrateze la rândul lor înainte de a reuși să scape.

Prin urmare, este propusă următoarea procedură (24) (25):

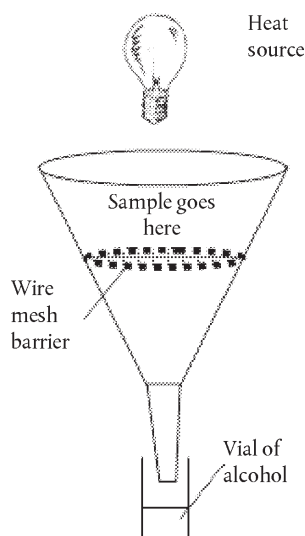
Aparatură: pâlnie Tullgren sau metode comparabile precum, de exemplu, metoda McFadyen (încălzire pe deasupra, eșantionul este așezat pe o pâlnie)

Regimul de încălzire: 25 °C timp de 12 ore, 35 °C timp de 12 ore, 45 °C timp de 24 de ore (în total 48 de ore). Temperatura trebuie măsurată în substrat.

Lichidul de fixare: etanol la 70 %

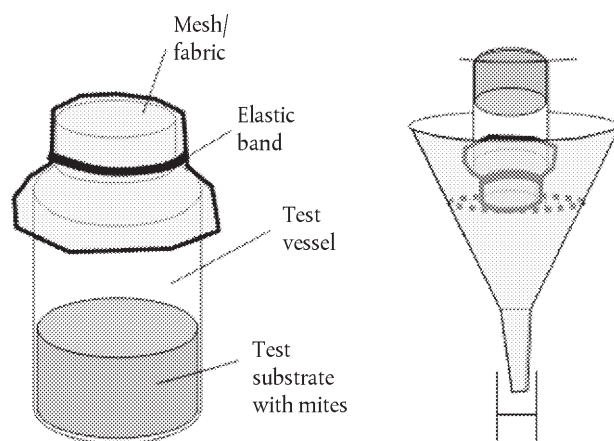
Detalii: Luați flaconul din sticlă care a fost utilizat pentru test. Scoateți capacul și înfășurați gura flaconului cu o bucată de plasă sau de țesătură. Țesătura trebuie să aibă o dimensiune a ochiurilor cuprinsă între 1,0 și 1,5 mm. Fixați țesătura cu o bandă elastică. Răsturnați cu atenție flaconul și așezați-l în aparatul de extracție. Țesătura împiedică substratul să se scurgă în lichidul de fixare, însă permite acarienilor să iasă din eșantion. Începeți procesul de încălzire după introducerea tuturor flacoanelor. Încheiați extracția după 48 de ore. Îndepărtați flacoanele de fixare și numărați acarienii cu ajutorul unui microscop de disecție.

Eficiența de extracție a metodei alese trebuie să fi fost demonstrată o dată sau de două ori pe an cu ajutorul unor vase care conțin un număr cunoscut de exemplare tinere și de acarieni adulți crescuți într-un substrat de testare netratat. Eficiența trebuie să fie  $\geq 90$  % în medie combinată pentru toate stadiile de dezvoltare.

**Dispozitivul de extracție de tip Tullgren**

**▼ M6**

Modul de pregătire a flaconului de testare după finalizarea testului, înainte de extracție



## ▼ M6

## Apendicele 6

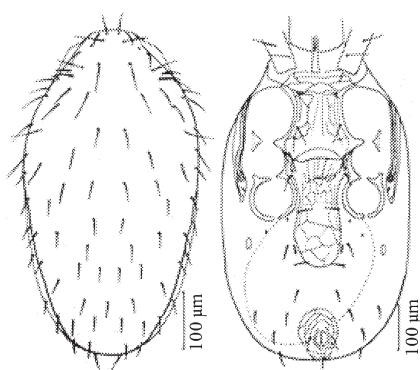
Identificarea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

|                                 |            |   |
|---------------------------------|------------|---|
| Subclasă/ordin/subordin:        | Familia:   | Genul/subgenul/specia:                  |
| Acarieni/Parazitiforme/Gamasida | Laelapidae | <i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i> |

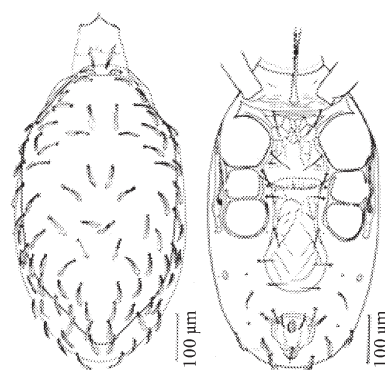
|                  |  |
|------------------|--|
| Autorul și data: | F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 ianuarie 2007 |
|------------------|--|

|              |  |
|--------------|--|
| Bibliografie | <p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, a 2-a ediție revizuită: 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.</p> |
|--------------|--|

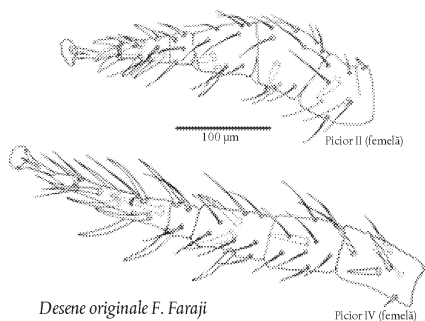
|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Caracteristici de determinare: | <p>Înveliș cu marginea denticulată rotunjită; caneluri hipostomatice cu mai mult de 6 denticule; peri dorsali caudali Z4 nu foarte lungi; peri dorsali setiformi; scut genital normal, nu foarte dezvoltat și care nu atinge scutul anal; partea posterioară a scutului dorsal fără peri nepereche; picioarele II și IV cu câțiva peri mari și groși; păr dorsal Z5 de aproape două ori mai lung decât J5; deget fix de chelicer cu 12-14 dinți și deget mobil cu 2 dinți; Idiosoma 520-685 μm lungime.</p> <p><i>Hypoaspis miles</i> este utilizat și în controlul biologic și poate fi confundat cu <i>H. aculeifer</i>. Principala diferență este:</p> <p><i>H. miles</i> aparține subgenului <i>Cosmolaelaps</i> și are peri dorsali sub formă de lamă în timp ce <i>H. aculeifer</i> aparține subgenului <i>Geolaelaps</i> și are peri dorsali setiformi.</p> |
|--------------------------------|--|



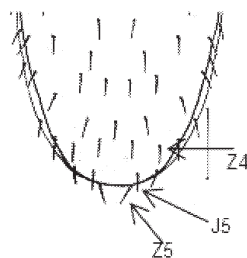
Hypoaspis aculeifer După Hughes, 1976



Hypoaspis miles După Hughes, 1976



Desene originale F. Faraji

Hypoaspis aculeifer,  
scut dorsal cu peri setiformi caracteristici

## ▼ M6

## Apendicele 7

**Informații de bază privind biologia acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer***

*Hypoaspis aculeifer* aparține familiei *Lealapidae*, ordinul Acari (acarieni), clasa Arahnide, încrângătura *Arthropoda*. Aceștia trăiesc în toate tipurile de sol și se hrănesc cu alți acarieni, nematode, enchitreide și colembule (26). În lipsă de hrană, aceștia devin canibali (27). Acarienii prădători sunt segmentați în *Idiosoma* și *Gnathosoma*. Nu există o diferențiere clară între *Idiosoma* din *Prosoma* (cap) și *Opisthosoma* (abdomen). *Gnathosoma* (scutul de pe cap) conține instrumentele de hrănire precum pedipalpi și chelicere. Chelicerele sunt trifurcate și prevăzute cu dinți de diferite forme. În afară de ingestie, masculii își folosesc chelicerele în principal pentru transferul spermatoforelor la femele. *Idiosoma* este acoperită aproape în totalitate de un scut dorsal. O mare parte din *Idiosoma* femelei este ocupată de organele de reproducere care se pot distinge în special cu puțin timp înainte de pontă. Pe partea ventrală, se găsesc două scuturi, scutul sternal și scutul genital. Toate picioarele sunt prevăzute cu țepi și gheare. Țepii sunt folosiți pentru ancorare în timpul deplasării în sol și pe sol. Prima pereche de picioare este utilizată în principal ca antenă. A doua pereche de picioare este utilizată nu numai pentru deplasare, ci și pentru imobilizarea prăzii. Ghearele de la cea de a patra pereche de picioare pot servi ca protecție, precum și ca „motor de deplasare” (28). Masculii au o lungime cuprinsă între 0,55 și 0,65 mm și o greutate cuprinsă între 10 și 15 μg. Femelele au o lungime cuprinsă între 0,8 și 0,9 mm și o greutate cuprinsă între 50 și 60 μg (8) (28) (Fig. 1).

Figura 1

**Femelă, mascul, protonimfă și larvă de *H. aculeifer*.**



La o temperatură de 23 °C, acarienii devin maturi din punct de vedere sexual după 16 zile (femelele) și, respectiv, după 18 zile (masculii) (6). Femelele transportă spermatozoizii prin solenostom de unde vor fi transferați în ovar. În ovar, spermatozoizii trec printr-un proces de maturizare și vor fi stocați. Fertilizarea are loc numai după maturizarea spermatozoizilor în ovar. Ovulele fecundate sau nefecundate vor fi depuse de femele în grămadă sau separat, de preferință în crăpături sau orificii. Femelele care s-au împerecheat pot purta exemplare de ambele sexe, în timp ce ouăle de la femelele care nu s-au împerecheat pot produce doar masculi. Pe parcursul dezvoltării până la stadiul de adult, acarienii traversează patru stadii de dezvoltare (ou – larvă, larvă – protonimfă, protonimfă – deutonimfă, deutonimfă – adult).

Oul este alb lăptos, hialin și eliptic, are o lungime de aproximativ 0,37 mm și o coajă tare. Conform celor menționate în referința (8), larvele au o dimensiune cuprinsă între 0,42 și 0,45 mm. Acestea au doar trei perechi de picioare. În regiunea capului, se dezvoltă pedipalpi și chelicere. Chelicerele, prevăzute cu câțiva dinți mici, sunt folosite pentru eclozare. La ieșirea din cocon, după 1-2 zile de la eclozare, se dezvoltă protonimfele. Acestea sunt, de asemenea, albe, au

**▼ M6**

o dimensiune cuprinsă între 0,45 și 0,62 mm (8) și patru perechi de picioare. Chelicerele sunt în întregime acoperite cu dinți. Din acest stadiu, acarienii încep să își caute hrana. Din acest motiv, cuticula prăzii este străpunsă cu chelicerele și este eliberată în pradă o secreție care permite digestia extraintestinală. Amestecul de hrană poate fi apoi absorbit de către acarian. Chelicerele pot fi utilizate și la sfâșierea bucăților de hrană pentru a extrage din acestea particulele mai mari (28). Deutonomifele se dezvoltă după îndepărtarea unui alt strat al oului. Acestea au o dimensiune cuprinsă între 0,60 și 0,80 mm (8) și au o culoare galbenă spre maro deschis. Din acest stadiu, acestea pot fi separate în femele și masculi. În următoarea fază de eclozare, timp în care animalele sunt inactive și se dezvoltă scutul de culoare maro (după aproximativ 14 zile), acarienii ating stadiul de adulți (28) (29) (30). Ciclul lor de viață este cuprins între 48 și 100 de zile la o temperatură de 25 °C (27).

▼ **M6**

## Apendicele 8

**Rezumatul și calendarul principalelor măsuri care trebuie luate pentru efectuarea testului pe *hypoaspis***

| Timp (zile)<br>începutul testului = ziua 0 | Activitate/sarcină  |
|--|---|
| Ziua – 35<br>până la – 28                  | Transferul femelelor din cultura stoc în vase curate pentru inițierea sincronizării<br>2 zile mai târziu: extracția femelelor<br>de două-trei ori pe săptămână: furnizarea unei cantități suficiente de hrană   |
| Ziua – 5 (+/- 2)                           | Pregătirea solului artificial   |
| Ziua – 4 (+/- 2)                           | Determinarea capacității solului artificial de retenție a apei<br>Uscare peste noapte<br>Ziua următoare: cântărirea probelor și calcularea capacității de retenție a apei   |
| Ziua – 4 (+/- 2)                           | Umezirea în prealabil a solului artificial pentru a atinge 20 – 30 % din capacitatea de retenție a apei   |
| Ziua 0                                     | Începerea testului: adăugarea substanței chimice de testare în solul artificial<br>Introducerea a 10 femele în fiecare vas duplicat<br>Cântărirea fiecărei probe duplicat<br>Pregătirea de probe de control abiotice pentru măsurarea gradului de umezeală și a pH-ului, 2 probe duplicat pentru fiecare tratament<br>Uscarea peste noapte a probelor de control<br>Ziua următoare: cântărirea probelor de control pentru determinarea umidității<br>Ziua următoare: măsurarea pH-ului din probele de control abiotice uscate |
| Ziua 3, 6, 9, 12 (aproximativ)             | Adăugarea în fiecare duplicat a unei cantități suficiente de pradă<br>Cântărirea fiecărei probe duplicat și, eventual, adăugarea unei cantități de apă echivalente cu cea evaporată   |
| Ziua 14                                    | Încheierea testului, efectuarea extracției din toate probele duplicat și din probele de control pentru verificarea eficienței extracției<br>Uscarea peste noapte a probelor de control care conțin apă<br>Ziua următoare: cântărirea probelor de control care conțin apă<br>Ziua următoare: măsurarea pH-ului din probele de control uscate   |
| Ziua 16                                    | Finalizarea extracției  |
| Ziua 16 +                                  | Înregistrarea numărului de adulți și de exemplare tinere din materialul extras<br>Raportarea rezultatelor în tabele-tip<br>Raportarea procedurii de testare în fișele pentru protocoalele de testare.   |



## ▼ M6

**C.37. TEST DE 21 DE ZILE PE PEȘTI: SCREENING CU DURATĂ SCURTĂ PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII ESTROGENICE ȘI ANDROGENICE ȘI A INHIBĂRII AROMATAZEI**

**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea de testare (*test guideline* – TG) nr. 230 a OCDE (2009). Necesitatea dezvoltării și validării unui test pe pești capabil să detecteze anumite substanțe chimice active endocrin își are originea în îngrijorările cu privire la faptul că anumite niveluri de substanțe chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât oamenilor, cât și faunei sălbatice, din cauza interacțiunii respectivelor substanțe chimice cu sistemul endocrin. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări pentru screeningul și testarea unor potențiali perturbatori endocrini. Un element al activității a constat în elaborarea unei orientări de testare pentru screeningul substanțelor chimice active asupra sistemului endocrin al unor specii de pești. Testul de screening endocrin de 21 de zile la pești a făcut obiectul unui amplu program de validare constând în studii interlaboratoare cu substanțe chimice selectate pentru a demonstra relevanța și fiabilitatea testului de detectare a substanțelor chimice estrogenice și inhibitoare ale aromatazei (1, 2, 3, 4, 5) la cele trei specii de pești investigate (*Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* și pește-lezebră); detectarea activității androgenice este posibilă la *Pimephales promelas* și *Oryzias latipes*, dar nu la pește-lezebră. Această metodă de testare nu permite detectarea substanțelor chimice cu efecte antiandrogenice. Activitatea de validare a fost revizuită *inter pares* de către un grup de experți desemnați de coordonatorii naționali ai programului privind orientarea de testare (6). Testul nu este conceput pentru a identifica mecanismele specifice ale perturbărilor hormonale deoarece animalele testate au axul hipotalamo-hipofizo-gonadal (*hypothalamic-pituitary-gonadal* – HPG) intact, care poate reacționa la substanțele chimice care au efecte asupra axului HPG la diferite niveluri. Testul de reproducere cu durată scurtă pe pești (TG 229 a OCDE) include fertilitatea și, dacă este cazul, histopatologia gonadală a *Pimephales promelas*, precum și toți parametri studiați incluși în această metodă de testare. TG 229 a OCDE descrie screeningul substanțelor chimice care afectează reproducerea prin diferite mecanisme, inclusiv endocrine. Acesta fapt ar trebui luat în considerare înainte de selectarea celei mai adecvate metode de testare.
2. Această metodă de testare descrie un test de screening *in vivo* în cadrul căruia pești masculi maturi din punct de vedere sexual și pești femele ovulante sunt ținuti împreună și expuși la o substanță chimică pe parcursul unei durate limitate a ciclului lor de viață (21 de zile). La finalul perioadei de expunere de 21 de zile, în funcție de specia testată, se măsoară unul sau doi biomarkeri cu rol de parametru, la masculi și la femele, ca indicatori ai efectelor estrogenice, de inhibare a aromatazei sau androgenice ale substanței chimice testate; acești parametri sunt vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare. Vitelogenina se măsoară la *Pimephales promelas*, la *Oryzias latipes* și la pește-lezebră, în timp ce caracteristicile sexuale secundare se măsoară doar la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes*.
3. Acest test biologic servește drept test de screening *in vivo* pentru anumite moduri endocrine de acțiune, iar aplicarea sa ar trebui considerată în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini” (28).

**CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI**

4. Vitelogenina este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la circulația estrogenului endogen. Ea este un precursor al proteinelor din vitellus și, după ce este produsă în ficat, circulează prin sânge la ovar, unde este absorbită și modificată de ouăle în dezvoltare. Vitelogenina este aproape nedetectabilă în plasma peștilor imaturi, femele și masculi, deoarece nu au suficient estrogen circulant; cu toate acestea, ficatul are capacitatea de a sintetiza și de a secreta vitelogenină ca răspuns la o stimulare estrogenică exogenă.

## ▼ M6

5. Măsurarea vitelogeninei servește la detectarea substanțelor chimice cu diferite moduri estrogenice de acțiune. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției vitelogeninei la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter pares* [ex. (7)]. Inducția vitelogeninei a fost demonstrată și în urma expunerii la androgeni aromatizabili (8, 9). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17 $\beta$ -estradiol, determină o reducere a nivelului de vitelogenină, care se utilizează pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei (10, 11). Relevanța biologică a răspunsului vitelogeninei ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este bine stabilită și a fost amplu documentată. Cu toate acestea, este posibil ca producția de vitelogenină la femele să fie afectată și de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine, de exemplu de hepatotoxicitate.
6. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate cu succes și standardizate pentru utilizarea de rutină. Acesta este cazul metodelor cu specificitate de specie utilizând testul de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), în care se utilizează imunochimia pentru a cuantifica vitelogenina produsă în probe mici de sânge sau hepatice prelevate de la pești individuali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Pentru măsurarea vitelogeninei, de la *Pimephales promelas* prelevează probe de sânge, de la peștele-zebră se prelevează probe de sânge sau omogenat din cap/coadă, iar de la *Oryzias latipes* se prelevează probe hepatice. În cazul *Oryzias latipes*, există o bună corelație între vitelogenina măsurată în sânge și cea măsurată în ficat (19). În apendicele 6 sunt descrise procedurile recomandate pentru prelevările efectuate în scopul măsurării vitelogeninei. Seturile pentru măsurarea vitelogeninei sunt disponibile pe scară largă; respectivele seturi trebuie să fie bazate pe o metodă ELISA validată, cu specificitate de specie.
7. Caracteristicile sexuale secundare ale peștilor masculi de anumite specii sunt vizibile la exterior, cuantificabile și sensibile la nivelurile de androgeni endogeni circulanți; acesta este cazul pentru *Pimephales promelas* și *Oryzias latipes* – însă nu și pentru peștele-zebră, care nu are caracteristici sexuale secundare cuantificabile. Femelele își păstrează capacitatea de a dezvolta caracteristici sexuale secundare masculine atunci când sunt expuse la substanțe chimice androgenice din apă. În literatura de specialitate există mai multe studii pentru a documenta acest tip de răspuns în cazul *Pimephales promelas* (20) și al *Oryzias latipes* (21). O atenuare a caracteristicilor sexuale secundare ale masculilor ar trebui interpretată cu prudență din cauza puterii statistice mici și ar trebui să fie bazată pe opiniile experților și pe greutatea dovezilor. Există limitări în ceea ce privește utilizarea peștelui-zebră în acest test din cauza absenței caracteristicilor sexuale secundare cuantificabile sensibile la substanțe chimice cu efecte androgenice.
8. În cazul *Pimephales promelas*, principalul indicator al expunerii la androgeni exogeni este numărul de tuberculi nupțiali situați pe botul femelei. În cazul femelelor de *Oryzias latipes*, numărul de procese papilare constituie principalul indicator al expunerii exogene la substanțe chimice cu efecte androgenice. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale ale *Pimephales promelas* și, respectiv, ale *Oryzias latipes* sunt indicate în apendicele 5A și în apendicele 5B.
9. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

## PRINCIPIUL TESTULUI

10. În cadrul testului, masculii și femelele aflați în stadiu de reproducere sunt expuși împreună în vase de testare. Stadiul de adult și cel reproducător al acestora permite o diferențiere clară a fiecărui sex și, în consecință, o analiză a fiecărui parametru în funcție de sex, și asigură sensibilitatea lor la substanțe chimice exogene. La finalul testului, sexul este confirmat

▼ **M6**

printr-o examinare macroscopică a gonadelor după incizia ventrală a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci. O prezentare generală a condițiilor de biotestare relevante este redată în apendicele 2. Testul se efectuează în mod normal pe pești selectați dintr-o populație capabilă să elibereze gameți; nu trebuie utilizate animale senescente. Orientarea privind vârsta peștilor și stadiul de reproducere al acestora este inclusă în secțiunea privind selectarea speciei de pește. Testul este realizat utilizând trei concentrații de expunere la substanțe chimice, precum și un vas de control cu apă și un vas de control cu solvent, dacă este necesar. Pentru fiecare tratament se utilizează două vase sau vase duplicate (fiecare vas conținând 5 masculi și 5 femele) în cazul *Oryzias latipes* și al peștelui-zebră și patru vase sau vase duplicate (fiecare vas conținând 2 masculi și 4 femele) în cazul *Pimephales promelas*. Acest principiu permite acomodarea comportamentului teritorial al masculului de *Pimephales promelas* menținând în același timp o putere suficientă a testului. Expunerea se realizează timp de 21 de zile, iar prelevarea de probe de la pești se efectuează în cea de a 21 zi de expunere.

11. După prelevarea de probe în cea de a 21-a zi, toate animalele sunt eutanasiate. Caracteristicile sexuale secundare se măsoară în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes* (a se vedea apendicele 5A și apendicele 5B); se prelevează probe de sânge pentru determinarea vitelogeninei de la peștele-zebră și de la *Pimephales promelas*, ca alternativă putându-se preleva probe de la cap/coadă pentru determinarea vitelogeninei la peștele-zebră (apendicele 6); pentru măsurarea VTG în cazul *Oryzias latipes* se prelevează probe din ficat (apendicele 6).

## CRITERII DE ACCEPTARE A TESTULUI

12. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:
  - mortalitatea din vasele de control cu apă (sau cu solvent) nu trebuie să depășească 10 % la încheierea perioadei de expunere;
  - concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe parcursul întregii perioade de expunere de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);
  - temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1,5$  °C între vasele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută într-un interval de 2 °C în limitele de temperatură specificate pentru speciile testate (apendicele 2);
  - trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare în soluție a concentrațiilor substanței chimice utilizate în test în intervalul de  $\pm 20$  % din valorile medii măsurate.

## DESCRIEREA METODEI

**Aparatură**

13. Echipamentul obișnuit de laborator și în special următoarele:
  - (a) pH-metru și aparat de măsurare a oxigenului;
  - (b) echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;
  - (c) aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;
  - (d) bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și densitatea populației recomandate (a se vedea apendicele 2);
  - (e) substrat de reproducere pentru *Pimephales promelas* și peștele-zebră, apendicele 4 conține detaliile necesare;
  - (f) balanță cu precizie adecvată (adică precizie de  $\pm 0,5$  mg).

▼ **M6****Apă**

14. În cadrul testului poate fi utilizat orice tip de apă în care specia testată supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată corespunzătoare. Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Trebuie să aibă un pH cuprins în intervalul 6,5 – 8,5, dar pe durata unui test pH-ul trebuie să se încadreze într-un interval de  $\pm 0,5$  unități. Pentru a garanta faptul că apa de diluție nu influențează în mod negativ rezultatul testului (de exemplu prin formarea de complexe ale substanței chimice utilizate în testare) trebuie prelevate periodic probe pentru analiză. De exemplu, la fiecare trei luni trebuie măsurate metale grele (ex., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), anioni și cationi majori (ex.,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  și  $\text{SO}_4^{2-}$ ), pesticide (ex., organofosforice totale și organoclorurate totale), carbon organic total și solide în suspensie în cazul în care apa de diluție este cunoscută ca având calitate constantă. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe parcursul unei perioade de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni). Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 3.

**Soluții de testare**

15. Soluțiile de testare în concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testare în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot utiliza coloane de saturare (coloane de solubilitate). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație ca cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, un solvent poate constitui cea mai bună soluție din punct de vedere tehnic; trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acute a substanțelor și amestecurilor dificile (22). Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice. Documentul de orientare al OCDE recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100 μl/l. Cu toate acestea, o analiză recentă (23) a evidențiat îngrijorări suplimentare generate de utilizarea solvenților pentru testarea activității endocrine. Prin urmare, se recomandă reducerea la minimum concentrației solventului, dacă este necesar și dacă este posibil din punct de vedere tehnic (în funcție de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice utilizate în testare).
16. Va fi utilizat un sistem de testare cu flux continuu. Un astfel de sistem alimentează și diluează continuu o soluție stoc conținând substanța chimică utilizată în testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturare) pentru a furniza o serie de concentrații în incintele de testare. Debitul soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic, de preferință zilnic, pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Trebuie evitată utilizarea unor tuburi din plastic de calitate inferioară sau a altor materiale care pot conține substanțe biologice active. În momentul selectării materialului pentru sistemul de testare cu flux continuu trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței de testare de către respectivul material.

**Alegerea peștilor**

17. Peștii de testare trebuie selectați dintr-o populație de laborator, de preferință dintr-un singur stoc, care a fost aclimatizată timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare celor utilizate în test. Este important ca rata de încărcare și densitatea populației (pentru definiții, a se vedea apendicele 1) să fie adecvate pentru speciile utilizate în cadrul testului (a se vedea apendicele 2).
18. După o perioadă de aclimatizare de 48 de ore, se înregistrează mortalitățile și se aplică următoarele criterii:

**▼ M6**

- mortalități mai mari de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;
  - mortalități între 5 % și 10 % din populație: aclimatizare timp de alte șapte zile; dacă mortalitatea este mai mare de 5 % în timpul celei de a doua perioade de șapte zile, întregul lot se respinge;
  - mortalități mai mici de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă întregul lot
19. Peștii nu trebuie tratați de boli pe parcursul perioadei de aclimatizare, în perioada de preexpunere sau pe parcursul perioadei de expunere.

**Preexpunerea și selectarea peștilor**

20. Se recomandă o perioadă de preexpunere de o săptămână pe parcursul căreia animalele sunt introduse în vase similare cu cele utilizate în cadrul testului propriu-zis. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* pe parcursul întregii perioade de reținere și în faza de expunere. Faza de expunere începe cu pești adulți dimorfici din punct de vedere sexual selectați dintr-o populație de animale de laborator mature din punct de vedere reproductiv (de exemplu, prezentând caracteristici sexuale secundare clare, vizibile în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes*) și care eliberează activ gameți. Exclusiv pentru o orientare generală (și fără ca acest fapt să fie luat în considerare independent de observarea stadiului efectiv de reproducere al unui anumit lot de pești), *Pimephales promelas* trebuie să aibă aproximativ  $20 (\pm 2)$  de săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de  $25 \pm 2$  °C pe parcursul întregii lor vieți. *Oryzias latipes* trebuie să aibă aproximativ  $16 (\pm 2)$  săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de  $25 \pm 2$  °C pe parcursul întregii lor vieți. Peștii-zebră trebuie să aibă aproximativ  $16 (\pm 2)$  săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de  $26 \pm 2$  °C pe parcursul întregii lor vieți.

**PROTOCOLUL TESTULUI**

21. Se utilizează trei concentrații ale substanței chimice de testare, un vas de control (apă) și, dacă este necesar, un vas de control cu solvent. Datele pot fi analizate pentru a determina diferențele semnificative din punct de vedere statistic dintre răspunsurile corespunzătoare tratamentului și vaselor de control. Aceste analize vor oferi informații cu privire la necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe termen mai lung pentru a se detecta posibile efecte adverse (și anume, asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) ale substanței chimice, în loc de a fi utilizate în cadrul evaluării riscurilor (24).
22. În cazul peștelui-zebră și al *Oryzias latipes*, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculi și femele pentru fiecare nivel de tratament (5 masculi și 5 femele din fiecare dintre cele două vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare, după caz. În cazul *Pimephales promelas*, în cea de a 21-a zi de expunere, sunt prelevate probe de la masculi și femele (2 masculi și 4 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare.

**Selectarea concentrațiilor de testare**

23. În scopurile acestui test, cea mai mare concentrație de testare trebuie stabilită fie la concentrația maximă tolerată (CMT) obținută cu ajutorul unei metode de determinare a intervalului sau din alte date privind toxicitatea, fie la valoarea de 10 mg/l, fie la valoarea corespunzătoare solubilității maxime în apă, oricare este cea mai mică. CMT este definită ca fiind cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice având ca rezultat o rată a mortalității mai mică de 10 %. Utilizarea acestei metode presupune existența unor date empirice privind toxicitatea acută sau a altor date privind toxicitatea pe baza cărora poate fi estimată CMT. Estimarea CMT poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită analiză profesională.

**▼ M6**

24. Sunt necesare trei concentrații de testare, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește valoarea 10, și un control cu apă de diluție (și un control cu solvent, dacă este necesar). Se recomandă ca factorii de diferențiere să se încadreze în intervalul 3,2 și 10.

**PROCEDURA****Selectarea și cântărirea peștilor pentru testare**

25. Este important ca diferențele de greutate a peștilor să fie reduse la minimum la începutul testului. În apendicele 2 sunt prezentate intervalele recomandate de mărime corespunzătoare diferitelor specii pentru acest test. Pentru întregul lot de pești utilizați în cadrul testului, intervalul greutateilor individuale ale masculilor și femelelor la începutul testului trebuie menținut, dacă este posibil, în limite de  $\pm 20\%$  din media aritmetică a greutateii fiecărui sex. Se recomandă cântărirea unui subșantion din stocul de pești înainte de testare pentru a estima greutatea medie.

**Condiții de expunere***Durată*

26. Durata testului este de 21 de zile după o perioadă de preexpunere. Perioada de preexpunere recomandată este de o săptămână.

*Hrănirea*

27. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* cu hrană corespunzătoare (apendicele 2) într-o cantitate suficientă pentru menținerea condiției fizice. Trebuie evitată proliferarea microbilor și apariția turbidității apei. Ca orientare generală, rația zilnică poate fi împărțită în două sau trei porții egale administrate de mai multe ori pe zi, la intervale de cel puțin trei ore. Se acceptă o singură rație mai mare în special în weekenduri. Peștii nu trebuie hrăniți timp de 12 ore înainte de prelevarea probelor/necropsie.
28. Hrana peștilor trebuie evaluată pentru a detecta contaminanți precum pesticide organoclorurate, hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili policlorurați (BPC). Trebuie evitate alimente cu un nivel înalt de fitoestrogeni care ar compromite răspunsul în cadrul testului la un agonist de estrogen cunoscut (de exemplu, 17-beta estradiol).
29. Hrana neconsumată și materiile fecale trebuie înlăturate din vasele de testare cel puțin de două ori pe săptămână, de exemplu prin curățarea cu grijă a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon.

*Lumina și temperatura*

30. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2).

**Frecvența determinărilor și măsurărilor analitice**

31. Înainte de începerea perioadei de expunere, trebuie asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Trebuie stabilite toate metodele analitice necesare, incluzând cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în sistemul de testare. Pe parcursul testului, concentrațiile substanței chimice de testare sunt determinate la intervale regulate, astfel: debitul diluantului și cel al soluției stoc toxice trebuie verificate, de preferat zilnic, însă de cel puțin două ori pe săptămână, iar aceste fluxuri nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Se recomandă măsurarea concentrațiilor efective ale substanței chimice de testare în toate vasele la începutul testului și, ulterior, săptămânal.
32. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrațiile măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței chimice de testare în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de  $\pm 20\%$  din concentrația nominală, rezultatele pot fi fundamentate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.
33. Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45  $\mu\text{m}$ ) sau centrifugarea lor. Dacă este necesară, procedura recomandată este centrifugarea. Cu toate acestea, dacă materialul de testare nu se absoarbe în filtre, filtrarea este de asemenea acceptabilă.

▼ **M6**

34. Pe parcursul testului, oxigenul dizolvat, temperatura și pH-ul trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână. Duritatea și alcalinitatea totale trebuie măsurate cel puțin o dată pe săptămână în vasele de control și în vasul cu cea mai înaltă concentrație. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul dintre vasele de testare.

**Observații**

35. O serie de răspunsuri biologice generale (de exemplu, supraviețuirea) și esențiale (de exemplu, nivelurile de vitelogenină) sunt evaluate pe parcursul testului sau la încheierea acestuia. Măsurarea și evaluarea acestor parametri și utilitatea lor sunt descrise în continuare.

*Supraviețuire*

36. Peștii trebuie examinați zilnic pe parcursul perioadei de testare și orice caz de deces trebuie înregistrat, iar peștii morți trebuie îndepărtați cât mai rapid posibil. Peștii morți nu trebuie înlocuiți în vasele de control sau în vasele de tratament. Sexul peștilor morți în timpul testului trebuie stabilit printr-o evaluare macroscopică a gonadelor.

*Comportament și aspect*

37. Trebuie notat orice comportament anormal (în raport cu grupul de control); acesta ar putea include semne ale toxicității generale, inclusiv hiperventilația, înotul necoordonat, pierderea echilibrului, imobilitate sau hrănire atipice. În plus, trebuie observate anomaliile externe (precum hemoragia, modificările de culoare). Astfel de semne de toxicitate trebuie luate în considerare cu atenție în timpul interpretării datelor, deoarece ele pot indica concentrații la care biomarkerii activității endocrine nu sunt fiabili. Aceste observații referitoare la comportament pot furniza, de asemenea, informații calitative utile pentru potențialele viitoare cerințe în materie de testare a peștilor. De exemplu, a fost observată o agresivitate teritorială la masculii normali sau la femele masculinizate de *Pimephales promelas* prin expunere la androgenice; în cazul peștelui-zebră, comportamentul caracteristic de împerechere și de eliberare de gameți după răsăritul soarelui este redus sau stânjenit de expunerea la estrogenice sau la antiandrogenice.
38. Deoarece anumite elemente legate de aspect (în primul rând culoarea) se pot modifica rapid în timpul manipulării, este important să se realizeze observații calitative înainte de eliminarea animalelor din sistemul de testare. Experiența de până în prezent în ceea ce privește *Pimephales promelas* sugerează că anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce inițial modificări ale următoarelor caracteristici exterioare: culoarea corpului (deschisă sau închisă), modele de colorație (prezența unor dungi verticale) și forma corpului (regiunea capului și regiunea pectorală). Prin urmare, trebuie realizate observații privind aspectul fizic al peștilor pe parcursul testului și la încheierea studiului.

*Eutanasierea peștilor*

39. În ziua 21, adică la încheierea perioadei de expunere, peștii trebuie eutanașiți cu ajutorul unor cantități corespunzătoare de tricaină [metan sulfonat de tricaină, metacaină, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l, tamponată cu 300 mg/l NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonat de sodiu, CAS 144-55-8) pentru a reduce iritația mucoaselor; apoi sunt prelevate probe de sânge sau de țesut pentru determinarea vitelogeninei, conform explicațiilor din secțiunea privind vitelogenina.



## ▼ M6

*Observarea caracteristicilor sexuale secundare*

40. Anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce modificări ale caracteristicilor sexuale secundare specializate (numărul de tuberculi nupțiali la masculul de *Pimephales promelas*, procesele papilare la masculul de *Oryzias latipes*). În special, substanțele chimice cu anumite moduri de acțiune pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la animalele de sex opus; de exemplu, agonisti ai receptorilor androgenici, cum ar fi trenbolonul, metiltestosteronul și dihidrotosteronul pot cauza dezvoltarea de tuberculi nupțiali proeminenți la femelele de *Pimephales promelas* sau dezvoltarea de procese papilare la femelele de *Oryzias latipes* (11, 20, 21). De asemenea, s-a raportat faptul că agonistii receptorilor estrogenici pot reduce numărul de tuberculi nupțiali și dimensiunea depozitelor subcutanate dorsale ale masculilor adulți (25, 26). Aceste observații morfologice macroscopice pot furniza informații calitative și cantitative utile pentru potențialele viitoare cerințe privind testarea peștilor. Numărul și dimensiunea tuberculelor nupțiale ai *Pimephales promelas* și ale procesele papilare ale *Oryzias latipes* pot fi cuantificate direct sau, mai practic, în eșantioanele conservate. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes* sunt disponibile în apendicele 5A și, respectiv, apendicele 5B.

*Vitelogenina (VTG)*

41. Se prelevează sânge din artera/vena caudală cu un tub capilar microhematocrit heparinizat sau, alternativ, printr-o puncție cardiacă cu ajutorul unei seringi. În funcție de mărimea peștelui, volumul de sânge prelevat se încadrează în general între 5 și 60  $\mu$ l pe individ în cazul *Pimephales promelas* și între 5 și 15  $\mu$ l pe individ în cazul peștelui-zebră. Plasma este separată de sânge prin centrifugare și este depozitată cu inhibitori de protează la o temperatură de  $-80^{\circ}\text{C}$  până ce este analizată pentru a măsura vitelogenina. Alternativ, în cazul *Oryzias latipes* se va utiliza ficatul, iar în cazul peștelui-zebră, omogenatul de cap/coadă poate fi utilizat ca țesut-sursă pentru determinarea vitelogeninei (apendicele 6). Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă ELISA omologă validată, utilizând un standard omolog de VTG și anticorpi omologi. Se recomandă utilizarea unei metode capabile să detecteze nivelurile de VTG de ordinul a câteva ng/ml de plasmă (sau ng/mg de țesut), care reprezintă nivelul de fond la masculii neexpuși.
42. Controlul calității măsurării vitelogeninei se va realiza prin utilizarea de soluții standard, de probe-martor și, cel puțin, de teste duplicat. Pentru fiecare metodă ELISA, trebuie realizat un test al efectului matricial (efectul de diluție a probei) pentru a determina factorul de diluție minimă a probei. Fiecare placă ELISA utilizată pentru testele VTG trebuie să includă următoarele probe de control al calității: cel puțin 6 soluții standard de calibrare care acoperă intervalul de concentrații de vitelogenină preconizate și cel puțin o probă-martor de testare de legare nespecifică (analizată în duplicat). Absorbanța acestor probe-martor trebuie să fie mai mică de 5 % din absorbanța maximă a soluțiilor standard de calibrare. Vor fi analizate cel puțin două alicote (duplicat godeu) din fiecare diluție a probei. Duplicatul godeu care diferă cu un procent mai mare de 20 % trebuie reanalizate.
43. Coeficientul de corelație ( $R^2$ ) al curbelor de calibrare trebuie să fie mai mare de 0,99. Cu toate acestea, o corelație mare nu este suficientă pentru a garanta o predicție adecvată a concentrației pentru toate intervalele. În plus față de o corelație suficient de mare pentru curba de calibrare, concentrația fiecărei soluții standard, calculată pornind de la curba de calibrare, trebuie să se încadreze între 70 și 120 % din concentrația sa nominală. În cazul în care concentrațiile nominale tind să se îndepărteze de linia de



▼ **M6**

regresie a calibrării (de exemplu, spre concentrații mai mici), poate fi necesară împărțirea curbei de calibrare în intervale de concentrații mici și mari sau utilizarea unui model neliniar pentru a ajusta în mod adecvat datele privind absorbanta. În cazul împărțirii curbei, ambele segmente de linie trebuie să aibă valoarea  $R^2 > 0,99$ .

44. Limita de detecție (LOD) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice, iar limita de cuantificare (LOQ) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice înmulțită cu cel mai mic factor de diluție.
45. În fiecare zi în care sunt efectuate măsurări ale vitelogeninei va fi analizată o probă fortificată utilizând un standard de referință interteste (apendicele 7). Raportul dintre concentrația preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

**DATE ȘI RAPORTARE****Evaluarea răspunsurilor biomarkerilor prin analiza varianței (ANOVA)**

46. Pentru a identifica potențiala activitate endocrină a unei substanțe chimice, răspunsurile grupurilor tratate sunt comparate cu cele ale grupurilor de control utilizând analiza varianței (ANOVA). În cazul în care se utilizează un solvent de control, trebuie efectuat un test statistic corespunzător între apa de diluție și solventul de control pentru fiecare parametru studiat. Orientări cu privire la interpretarea datelor referitoare la apa de diluție și solventul de control în cadrul analizei statistice ulterioare sunt disponibile în OCDE, 2006c (27). Toate datele privind răspunsurile biologice trebuie analizate și raportate separat per sex. Dacă nu sunt îndeplinite ipotezele necesare pentru metodele parametrice – distribuție anormală (de exemplu, testul Shapiro-Wilk) sau varianță eterogenă (testul Barlett sau testul Levene) – trebuie luată în considerare transformarea datelor în scopul omogenizării varianțelor înainte de efectuarea analizei varianței sau efectuarea unei analize ponderate a varianței. Testul Dunnett (parametric) care permite comparații multiple pe perechi sau testul Mann-Whitney cu ajustare Bonferroni (neparametrică) poate fi utilizat pentru un raport doză-răspuns nemonoton. Pot fi utilizate alte teste statistice (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra sau testul Williams), în cazul în care raportul doză-răspuns este aproximativ monoton. În apendicele 8 este furnizată o diagramă statistică care ajută la luarea unei decizii cu privire la alegerea testului statistic cel mai adecvat pentru a fi utilizat. Informații suplimentare pot fi obținute și din Documentul OCDE privind metodele actuale de analiză statistică a datelor de ecotoxicitate (27).

**Raportarea rezultatelor testului**

47. Datele studiului trebuie să includă:

*Facilitatea de testare:*

- Personalul responsabil și responsabilitățile sale în cadrul studiului
- Fiecare laborator trebuie să își fi demonstrat competența prin utilizarea unei game de substanțe chimice reprezentative

*Substanța chimică de testare:*

- Caracterizarea substanței chimice de testare
- Natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante

**▼ M6**

— Metoda și frecvența preparării concentrațiilor de testare

— Informații privind stabilitatea și biodegradabilitatea

*Solventul:*

— Caracterizarea solventului (natura, concentrația utilizată)

— Justificarea alegerii solventului (în cazul în care acesta nu este apa)

*Animalele pentru testare:*

— Specia și subspecia

— Furnizorul și unitatea specifică a furnizorului

— Vârsta peștilor la începutul testului și stadiul de reproducere/de eliberare a gameților

— Detalii cu privire la procedura de aclimatizare a animalelor

— Greutatea corporală a peștilor la începutul expunerii (dintr-un subșantion din stocul de pești)

*Condiții de testare:*

— Procedura de testare utilizată (tipul testului, rata de încărcare, densitatea populației, etc.);

— Metoda de preparare a soluțiilor stoc și debitul;

— Concentrațiile nominale de testare, concentrațiile măsurate săptămânal ale soluțiilor de testare și metoda analitică utilizată, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard în vasele de testare și dovada faptului că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței chimice de testare în soluție veritabilă;

— Caracteristicile apei de diluție (incluzând pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual, carbonul organic total, solidele în suspensie și orice altă măsurătoare efectuată)

— Calitatea apei din vasele de testare: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;

— Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul de aliment (alimente), sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele privind contaminanți relevanți, dacă sunt disponibile (de exemplu, BPC, HAP și pesticide organoclorurate)].

*Rezultate*

— Dovada că soluțiile de control îndeplinesc criteriile de acceptare a testului;

— Datele privind mortalitățile pentru fiecare nivel de concentrație de testare și pentru fiecare control;

— Tehnicile de analiză statistică utilizate, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor utilizate;

— Datele privind observațiile biologice de morfologie macroscopică, inclusiv caracteristicile sexuale secundare și vitelogenina;

## ▼ M6

- Rezultatele analizelor datelor, de preferință sub formă de tabele și de grafice;
- Incidența oricărei reacții neobișnuite a peștilor și a oricărui efect vizibil provocat de substanța chimică de testare

## ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR TESTULUI

48. Această secțiune include câteva observații care trebuie luate în considerare pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește diferiții parametri măsurați. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul în care substanța chimică de testare pare a cauza semne evidente de toxicitate sau a afecta starea generală a animalului testat.
49. La stabilirea intervalului de concentrații de testare, nu trebuie să se depășească concentrația maximă tolerată pentru a permite o interpretare corespunzătoare a datelor. Este important să se aplice cel puțin un tratament care să nu determine semne ale unor efecte toxice. Semnele de boală și semnele unor efecte toxice trebuie evaluate și raportate în detaliu. De exemplu, producția de VTG la femele poate fi, de asemenea, afectată de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine, de exemplu de hepatotoxicitate. Cu toate acestea, interpretarea efectelor poate fi consolidată prin alte niveluri de tratament, ele nefiind mascate de toxicitatea sistemică.
50. Există câteva aspecte care trebuie luate în considerare pentru acceptarea rezultatelor testului. Cu titlu orientativ, nivelurile de VTG la grupele de control de masculi și de femele trebuie să fie distincte și separate de aproximativ trei ordine de mărime în cazul *Pimephales promelas* și al peștelui-zebră și de aproximativ un ordin de mărime în cazul *Oryzias latipes*. Exemple ale intervalului de valori întâlnite la grupele de control și la grupele tratate sunt disponibile în rapoartele de validare (1, 2, 3, 4). Valori mari ale VTG la masculii din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta agonistii estrogenici slabi. Valori mici ale VTG la femelele din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta inhibitorii aromatazei și antagoniștii estrogenici. Studiile de validare au fost utilizate pentru a elabora această orientare.
51. În cazul în care un laborator nu a realizat anterior testul sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea subspeciei sau a furnizorului de pești), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică. Se recomandă utilizarea unor substanțe chimice care posedă o serie de moduri de acțiune sau de impacturi asupra unor parametri studiați. Practic, fiecare laborator este încurajat să își elaboreze propriile date istorice de control pentru masculi și femele și să efectueze teste cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea estrogenică (de exemplu, 17 $\beta$ -estradiol la 100 ng/l sau un agonist slab cunoscut) având ca rezultat creșterea VTG la masculi, cu o substanță chimică de control pozitivă pentru inhibarea aromatazei (de exemplu, fadrozol sau procloraz la 300  $\mu$ g/l) având ca rezultat scăderea VTG la femele și cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea androgenică (de exemplu, 17 $\beta$ -trenbolon la 5  $\mu$ g/l) având ca rezultat inducerea caracteristicilor sexuale secundare la femelele de *Pimephales promelas* și de *Oryzias latipes*. Toate aceste date pot fi comparate cu datele disponibile din studiile de validare (1, 2, 3) pentru a garanta competența laboratorului.
52. În general, măsurătorile vitelogeninei trebuie considerate pozitive în cazul unei creșteri semnificative statistic a VTG la masculi ( $p < 0,05$ ) sau în cazul unei scăderi semnificative statistic la femele ( $p < 0,05$ ) cel puțin la doza maximă testată în comparație cu grupul de control și în absența semnelor de toxicitate generală. Un rezultat pozitiv este confirmat și prin demonstrarea unei relații plauzibile din punct de vedere biologic între doză și curba răspunsurilor. Astfel cum s-a menționat anterior, scăderea vitelogeninei poate să nu fie în totalitate de origine endocrină; cu toate acestea, un rezultat pozitiv trebuie să fie, în general, interpretat ca o dovadă a activității endocrine *in vivo* și trebuie să genereze în mod normal acțiuni pentru clarificări suplimentare.

▼ **M6**

## BIBLIOGRAFIE

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.

▼ **M6**

- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\beta$ -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) 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. Paris
- (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.
- (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,” not „traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
- (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 $\beta$ -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

**▼ M6**

- (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MO-NO(2006)18
- (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MO-NO(2012)22

**▼ M6***Apendicele 1***Abrevieri și definiții**

**Substanță chimică:** o substanță sau un amestec

**CV:** coeficient de variație.

**ELISA:** test de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic.

**Rata de încărcare:** greutatea umedă a peștilor per volum de apă.

**Densitatea populației:** numărul de pești per volum de apă.

**VTG (vitelogenină):** fosfolipoglicoproteină precursoră a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

**Axul HPG:** axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

**CMT:** concentrația maximă tolerată, reprezentând aproximativ 10 % din CL<sub>50</sub> (concentrația letală).

**Substanța chimică de testare:** orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

## ▼ M6

## Apendicele 2

## Condiții experimentale pentru testul de screening endocrin la pești

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| 1. Specii recomandate  | <i>Pimephales promelas</i>  | <i>Oryzias latipes</i>  | <b>Peștele-zebră</b><br>( <i>Danio rerio</i> )  |
| 2. Tip de test   | În regim dinamic  | În regim dinamic  | În regim dinamic  |
| 3. Temperatura apei  | 25 ± 2 °C   | 25 ± 2 °C   | 26 ± 2 °C   |
| 4. Calitatea iluminatului  | Becuri fluorescente (spectru larg)  | Becuri fluorescente (spectru larg)  | Becuri fluorescente (spectru larg)  |
| 5. Intensitatea luminii  | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)   | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)                                     | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)                                     |
| 6. Perioada de expunere la lumină (tranzițiile răsărit-apus sunt opționale, cu toate acestea nu sunt considerate necesare) | 16 h de lumină, 8 h de întuneric  | 12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric  | 12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric  |
| 7. Rata de încărcare   | < 5 g/l   | < 5 g/l   | < 5 g/l   |
| 8. Dimensiunea camerelor de testare  | 10 l (minimum)  | 2 l (minimum)   | 5 l (minimum)   |
| 9. Volumul soluției de testare   | 8 l (minimum)   | 1,5 l (minimum)   | 4 l (minimum)   |
| 10. Volumele soluțiilor de testare schimbate   | Minimum 6/zi  | Minimum 5/zi  | Minimum 5/zi  |
| 11. Vârsta organismelor testate  | A se vedea punctul 20.  | A se vedea punctul 20.  | A se vedea punctul 20.  |
| 12. Greutatea umedă aproximativă a peștilor adulți (g)   | Femele: 1,5 ± 20 %<br>Masculi: 2,5 ± 20 %   | Femele: 0,35 ± 20 %<br>Masculi: 0,35 ± 20 %   | Femele: 0,65 ± 20 %<br>Masculi: 0,4 ± 20 %  |
| 13. Nr. de pești per vas de testare  | 6 (2 masculi și 4 femele)   | 10 (5 masculi și 5 femele)  | 10 (5 masculi și 5 femele)  |
| 14. Nr. de tratamente  | = 3 (plus controalele corespunzătoare)  | = 3 (plus controalele corespunzătoare)  | = 3 (plus controalele corespunzătoare)  |
| 15. Nr. de vase per tratament  | 4 minimum   | 2 minimum   | 2 minimum   |
| 16. Nr. de pești per concentrație testată  | 16 femele adulte și 8 masculi adulți (4 femele și 2 masculi în fiecare vas duplicat)  | 10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)   | 10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)   |
| 17. Regimul de hrănire   | Adulți sau nauplius de <i>Artemia</i> , vii sau congelați, de două sau de trei ori pe zi ( <i>ad libitum</i> ), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate | Nauplius de <i>Artemia</i> de două sau de trei ori pe zi ( <i>ad libitum</i> ), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate | Nauplius de <i>Artemia</i> de două sau de trei ori pe zi ( <i>ad libitum</i> ), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate |



## ▼ M6

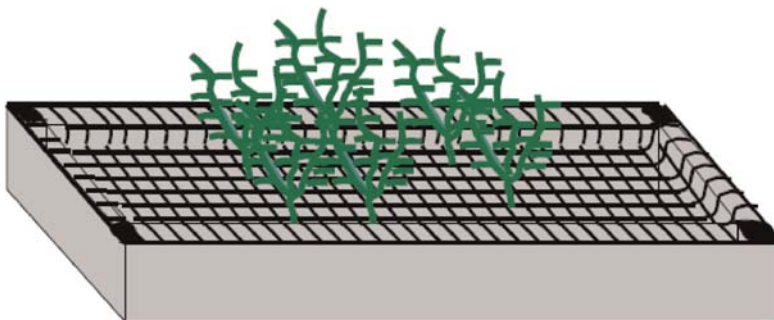
|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| 18. Aerarea                               | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer   | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer   | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer   |
| 19. Apa de diluție                        | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată  | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată  | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată  |
| 20. Perioada de preexpunere               | Perioadă recomandată de 7 zile   | Perioadă recomandată de 7 zile   | Perioadă recomandată de 7 zile   |
| 21. Durata expunerii la substanța chimică | 21 de zile   | 21 de zile   | 21 de zile   |
| 22. Parametri biologici studiați          | supraviețuire<br>comportament<br>caracteristici sexuale secundare<br>VTG   | supraviețuire<br>comportament<br>caracteristici sexuale secundare<br>VTG   | supraviețuire<br>comportament<br>VTG   |
| 23. Criterii de acceptare a testului      | Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de $25 \pm 2$ °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament. | Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de $24 \pm 2$ °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament. | Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de $26 \pm 2$ °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament. |

**▼ M6***Apendicele 3***Câteva caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile**

| Componentă  | Concentrații |
|---|--------------|
| Particule în suspensie                                      | < 20 mg/l    |
| Carbon organic total  | < 2 mg/l     |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l     |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l    |
| Total pesticide organofosforice                             | < 50 ng/l    |
| Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l    |
| Total clor organic  | < 25 ng/l    |

▼ **M6***Apendicele 4 A***Substratul de reproducere pentru peștele-zebră**

**Tavă de reproducere:** tavă instrumentară în întregime din sticlă, cu dimensiuni de exemplu de  $22 \times 15 \times 5,5$  cm ( $L \times l \times i$ ), acoperită cu o sită mobilă din oțel inoxidabil (orificii de 2 mm). Sita trebuie să acopere deschiderea tăvii instrumentare la un nivel situat mai jos decât marginea ei.



Substratul de reproducere se fixează pe sită. Se formează o structură în care pot pătrunde peștii. De exemplu, sunt adecvate plante de acvariu artificiale realizate din plastic de culoare verde (NB: trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței chimice de testare în materialul din plastic). Plasticul trebuie să fie curățat cu o cantitate suficientă de apă caldă pentru o perioadă suficientă pentru a se asigura că nicio substanță chimică nu poate pătrunde în apa de testare. Dacă se utilizează materiale din sticlă, trebuie avut grijă ca peștii să nu se rănească sau să se îngheșue în timpul deplasărilor.

Distanța dintre tavă și pereții din sticlă trebuie să fie de cel puțin 3 cm pentru a se asigura că eliberarea gameților nu se realizează în afara tăvii. Ouăle depuse pe tavă cad printre ochiurile sitei și pot fi prelevate la 45-60 de minute după pornirea iluminării. Ouăle transparente nu se lipesc și pot fi ușor numărate în condiții de iluminare transversală. Atunci când se utilizează cinci femele pentru fiecare vas, numărul de ouă este considerat mic dacă este de maximum 20 pe zi, mediu dacă este de maximum 100 și mare dacă este peste 100. Tava de reproducere trebuie îndepărtată, ouăle colectate, iar tava reintrodusă în vasul de testare, fie seara la o oră cât mai târzie, fie dimineața foarte devreme. Perioada până la reintroducere nu trebuie să depășească o oră, întrucât, în caz contrar, semnalul substratului de reproducere poate induce împerecherea individuală și eliberarea gameților într-un moment neobișnuit. Dacă situația impune introducerea mai târziu a tăvii de reproducere, aceasta trebuie să se efectueze cu cel puțin 9 ore după pornirea iluminării. La această oră târzie din zi, eliberarea gameților nu mai este indusă.

▼ **M6***Apendicele 4 B***Substratul de reproducere pentru *Pimephales promelas***

Două sau trei plăci și tăvi de reproducere din plastic/ceramică/sticlă sau oțel inoxidabil combinate sunt așezate în fiecare cameră de testare (de exemplu, un jgheab semicircular de culoare gri cu o lungime de 80 mm, așezat pe o tavă cu margini ridicate cu o lungime de 130 mm) (a se vedea imaginea). S-a demonstrat că plăcile din PVC sau din ceramică tratate în mod corespunzător sunt adecvate pentru un substrat de reproducere (Thorpe et al, 2007).

Se recomandă ca plăcile să fie șlefuite pentru a îmbunătăți aderența. Tava trebuie să fie, de asemenea, prevăzută cu un ecran de protecție pentru a împiedica accesul peștilor la ouăle căzute, cu excepția cazului în care eficiența aderenței ouălor a fost demonstrată pentru substratul de reproducere utilizat.



Baza este concepută pentru a reține toate ouăle care nu aderă la suprafața plăcilor și care, în consecință, ar cădea pe fundul bazinului (sau acele ouă să fie depuse direct pe baza plană din plastic). Toate substraturile de reproducere trebuie curățate înainte de utilizare timp de cel puțin 12 ore în apă de diluție.

**REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼ **M6***Apendicele 5 A***Evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* pentru detectarea anumitor substanțe chimice care acționează la nivel endocrin****Prezentare generală**

În cazul adulților de *Pimephales promelas*, caracteristicile aspectului fizic potențial importante în cadrul testării perturbatorilor endocrini includ culoarea corpului (deschisă/închisă), modelele de colorație (prezența sau absența unor dungi verticale), forma corpului (forma capului și a regiunii pectorale, distensia abdomenului), precum și caracteristicile sexuale secundare specializate (numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali, dimensiunea depozitului subcutanat dorsal și ovipozitorul).

Tuberculii nupțiali sunt situați pe cap (depozit subcutanat dorsal) la masculii de *Pimephales promelas* activi din punct de vedere reproductiv și sunt de obicei dispuși bilateral simetric (Jensen et al. 2001). Femelele de control și masculii și femelele tinere nu dezvoltă tuberculi (Jensen et al. 2001). La masculi, numărul de tuberculi individuali situați în jurul ochilor și între nări este de maximum opt. Cei mai mulți și mai mari tuberculi sunt așezați sub forma a două șiruri paralele imediat sub nări și deasupra gurii. Numeroși pești au grupuri de tuberculi sub mandibulă; cei situați cel mai aproape de gură apar în general într-o singură pereche, în timp ce setul situat mai ventral se poate compune din până la patru tuberculi. Numărul efectiv de tuberculi este rareori mai mare de 30 (interval 18-28; Jensen et al. 2001). Tuberculii predominanți (din punctul de vedere al numărului) sunt prezenți sub forma unei structuri singulare, relativ rotunde, cu înălțimea aproximativ echivalentă cu raza. Cei mai mulți masculi activi din punct de vedere reproductiv au, de asemenea, cel puțin câțiva tuberculi măriți și pronunțați astfel încât nu pot fi distinși ca structuri individuale.

Unele tipuri de substanțele chimice cu efecte la nivel endocrin pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la sexul opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi 17β-metiltestosteronul sau 17β-trenbolonul, pot cauza apariția de tuberculi nupțiali la femelele de *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), în timp ce agoniști ai receptorilor estrogenici pot reduce numărul sau dimensiunea tuberculilor nupțiali la masculi (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

În continuare este prezentată o descriere a caracterizării tuberculilor nupțiali la *Pimephales promelas* pe baza procedurilor utilizate în cadrul laboratorului Agenției de Protecție a Mediului din SUA din Duluth, Minnesota. Produsele și/sau echipamentele specifice pot fi înlocuite cu materiale comparabile aflate la dispoziție.

Vizualizarea se realizează cel mai bine cu ajutorul unei lupe iluminate sau al unui microscop de disecție 3X iluminat. Peștele este observat din partea dorsală și cu partea anterioară înainte (capul spre observator).

- a) Se așează peștele într-o placă Petri mică (de exemplu, cu diametrul de 100 mm), cu partea anterioară înainte și cu partea ventrală în jos. Se reglează vizorul pentru a putea identifica tuberculii. Se rulează peștele ușor și încet de pe o parte pe alta pentru a identifica zonele cu tuberculi. Se numără și se clasifică tuberculii.
- b) Se repetă observația pe partea ventrală a capului după ce s-a așezat peștele în placa Petri cu partea dorsală anterioară înainte.
- c) Observațiile nu ar trebui să dureze mai mult de 2 minute pentru fiecare pește.

▼ **M6****Numărarea și clasificarea tuberculilor**

Au fost identificate șase zone specifice pentru evaluarea prezenței și dezvoltării de tuberculi la adulții de *Pimephales promelas*. A fost creat un model pentru a cartografia localizarea și cantitatea tuberculilor prezenți (a se vedea partea de încheiere a prezentului apendice). Numărul tuberculilor este înregistrat, iar dimensiunea lor poate fi clasificată cantitativ astfel: 0- absent, 1-prezent, 2-mărit și 3-pronunțat pentru fiecare organism (Fig. 1).

Categoria 0 – absența oricărui tubercul. Categoria 1 – tubercul prezent, identificat ca orice tubercul care are un singur punct a cărui înălțime este aproape echivalentă cu raza sa (diametru). Categoria 2 – tubercul mărit, identificat prin țesutul sub formă de asterisc, prezentând de obicei o bază radială mare cu șanțuri sau caneluri care pornesc din centru. Cupola tuberculului este adesea mai neregulată, însă uneori poate fi întrucâtva rotunjită. Categoria 3 – tubercul pronunțat, de obicei foarte mare și rotunjit cu o structură mai puțin definită. Uneori, acești tuberculi se grupează formând o singură masă de-a lungul unei zone sau a mai multor zone (B, C și D, descrise mai jos). Culoarea și forma sunt similare celor din categoria 2, însă, uneori, sunt destul de greu de distins. Utilizând acest sistem de clasificare va conduce în general la un scor < 50 la un mascul normal din grupul de control care posedă un număr de tuberculi cuprins între 18 și 20 (Jensen et al. 2001).

*Figura 1*



Numărul efectiv de tuberculi la unii pești poate fi mai mare decât cel indicat în casetele model (apendicele A) pentru o anumită zonă de clasificare. În acest caz, cifrele suplimentare pot fi marcate în interior, la dreapta sau la stânga casetei. Prin urmare, modelul nu trebuie să afișeze o simetrie. O altă tehnică pentru cartografierea tuberculilor perechi sau grupați vertical de-a lungul planului orizontal al gurii ar putea consta în dubla marcare a două puncte de clasificare a tuberculilor într-o singură casetă.

Zonele cartografiate:

A – Tuberculi situați în jurul ochilor. Localizați dorsal spre ventral în jurul marginii anterioare a ochilor. De obicei multipli la masculii maturi din grupul de control, absenți la femelele din grupul de control, dispuși în general în perechi (câte unul lângă fiecare ochi) sau singuri la femelele expuse la androgeni.

B – Tuberculi situați între nări (porii canalelor senzoriale). De obicei dispuși în perechi la masculii din grupul de control la niveluri de dezvoltare mai mari (2-mărit sau 3- pronunțat). Absenți la femelele din grupul de control, însă uneori prezenți și dezvoltați la femelele expuse la androgeni.

C – Tuberculi situați imediat anterior nărilor, paralel cu gura. În general măriți sau pronunțați la masculii maturi din grupul de control. Prezenți sau măriți la masculii mai puțin dezvoltați sau la femelele tratate cu androgeni.

▼ **M6**

D – Tuberculi situați paralel cu linia gurii. În general clasificați ca dezvoltăți la masculii din grupul de control. Absenți la femelele din grupul de control, însă prezenți la femelele expuse la androgeni.

E – Tuberculi situați pe mandibulă, aproape de gură, de obicei de mici dimensiuni și în general dispuși în perechi. Variabili la masculii din grupul de control sau tratați și la femelele tratate.

F – Tuberculi situați ventral față de E. De obicei de mici dimensiuni și dispuși în perechi. Prezenți la masculii din grupul de control și la femelele expuse la androgeni.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- $\beta$  trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

**Model de tuberculi****Clasificare numerică****ID** \_\_\_\_\_

1-prezent

**Data** \_\_\_\_\_

2-mărit

**Scor total** \_\_\_\_\_

3-pronunțat

|  |          |           |           |           |           |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | <b>A</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|

|  |          |           |           |           |           |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | <b>B</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|

|  |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | <b>C</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> |
|  | <b>D</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> |

|  |          |           |           |           |           |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  |          | <b>E</b>  | <b>X1</b> | <b>X1</b> |           |
|  | <b>F</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> | <b>X1</b> |

▼ **M6***Apendicele 5 B***Evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Oryzias latipes* pentru detectarea anumitor substanțe chimice care acționează la nivel endocrin**

Mai jos este prezentată o descriere a măsurării proceselor papilare (\*), care sunt caracteristici sexuale secundare ale *Oryzias latipes*.

(\*) Procesele papilare apar în mod normal numai la masculii adulți și sunt situate pe nervurile înotătoare, pornind de la cea de a doua până la cea de a șaptea sau a opta nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale (Fig. 1 și 2). Cu toate acestea, procesele papilare apar rareori pe prima nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale. Această procedură de operare standard (POS) cuprinde măsurarea proceselor de pe prima nervură a înotătoarei (numărul nervurilor este calculat în cadrul acestei POS pornind de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale).

(1) După excizia ficatului (apendicele 6), carcasa este așezată într-un tub conic care conține aproximativ 10 ml de formol neutru 10 % tamponat (cu capul în sus și cu coada în jos). În cazul în care gonada este fixată într-o altă soluție decât formol neutru 10 % tamponat, se realizează cu ajutorul unei lame tăietoare o incizie transversală în carcasă între regiunea anterioară a înotătoarei anale și anus, având grijă să nu se lezeze gonoporul și gonada însăși (Fig. 3). Se introduce capul peștelui în soluția fixativă pentru a conserva gonadele, iar coada peștelui în formol neutru tamponat 10 % conform descrierii de mai sus.

(2) După ce se introduce corpul peștelui în formol neutru tamponat 10 %, se prinde regiunea anterioară a înotătoarei anale cu ajutorul unei pensete și se pliază timp de 30 de secunde pentru a menține deschisă înotătoarea anală. Prințând înotătoarea anală cu ajutorul unei pensete, se prind câteva nervuri ale înotătoarei din regiunea anterioară având grijă să nu se zgârie procesele papilare.

(3) După menținerea deschisă a înotătoarei anale timp de aproximativ 30 de secunde, se introduce corpul peștelui în formol neutru 10 % tamponat la temperatura camerei și se lasă astfel până la măsurarea proceselor papilare (măsurarea trebuie efectuată după fixare timp de cel puțin 24 de ore).

**Măsurare**

(1) După fixarea corpului peștelui în formol neutru 10 % tamponat timp de cel puțin 24 de ore, se scoate carcasa peștelui din tubul conic și se șterge formolul cu hârtie de filtru (sau un șervet de hârtie).

(2) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se taie apoi cu grijă înotătoarea anală cu ajutorul unei foarfeci mici de disecție (este de preferat să se taie înotătoarea anală cu puțin pterigiofor).

(3) Se prinde cu ajutorul unei pensete zona anterioară a înotătoarei anale excizate și se așează pe o lamelă din sticlă cu câteva picături de apă. Se acoperă apoi înotătoarea anală cu o altă lamelă din sticlă. Se procedează cu grijă pentru a nu se zgâria procesele papilare în momentul prinderii înotătoarei anale cu penseta.

(4) Se determină numărul de plăci comune care prezintă procese papilare cu ajutorul unui contor sub un microscop biologic (microscop drept sau microscop inversat). Procesele papilare sunt recunoscute atunci când o mică formațiune de procese este vizibilă pe marginea posterioară a plăcii



▼ **M6**

comune. Se notează pe foaia de lucru numărul de plăci comune care prezintă procese papilare pentru fiecare nervură a înotătoarei (de exemplu, prima nervură: 0, a doua nervură: 10, a treia nervură: 12, etc.) și se notează suma acestor numere în fișa Excel pentru fiecare pește în parte. Dacă este necesar, se fotografiază înotătoarea anală și se determină pe fotografie numărul de plăci comune care prezintă procese papilare.

- (5) După măsurare, se introduce înotătoarea anală în tubul conic descris la punctul (1) și se depozitează.

Fig. 1.

Diagramă care ilustrează diferența de formă și de dimensiune a înotătoarei anale între sexe. A, mascul; B, femelă. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

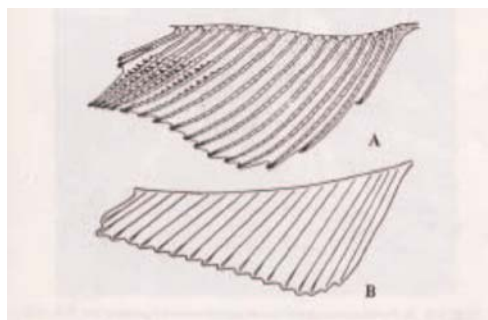


Fig. 2.

A, Procese papilare pe plăcile comune ale înotătoarei anale. J.P., placă comună; A.S., spațiu axial; P., proces. B, Extremitatea distală a înotătoarei anale. Actinotrichiile (Act.) sunt situate la vârf. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

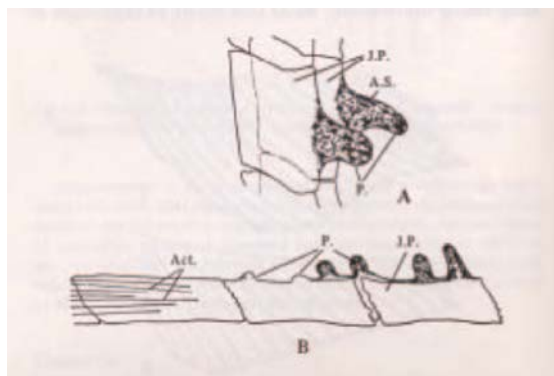
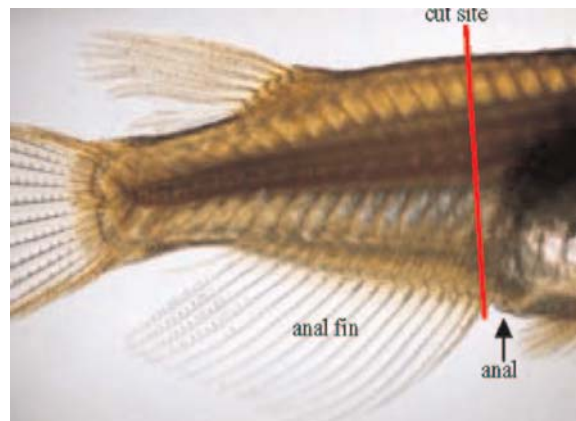


Fig. 3.

Fotografia unui corp de pește care ilustrează locul inciziei atunci când gonada este fixată într-o altă soluție de fixare decât formol neutru 10 % tamponat. În acest caz, corpul restant va fi tăiat între zona anterioară a înotătoarei anale și anus cu ajutorul unei lame tăietoare (linia roșie), iar capul peștelui va fi introdus în soluția de fixare pentru gonade și partea corpului dinspre coadă va fi introdusă în formol neutru 10 % tamponat.

▼ M6



▼ **M6***Apendicele 6***Proceduri recomandate de prelevare a probelor pentru analiza vitelogeninei**

Se procedează cu grijă pentru a evita contaminarea încrucișată între probele VTG ale masculilor și femelelor.

**Procedura 1 A: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din vena/artera caudală**

După anestezie, pedunculul caudal este parțial secționat cu o lamă de bisturiu și se recoltează sânge din vena/artera caudală cu un tub capilar heparinizat microhematocrit. După prelevarea sângelui, plasma este separată rapid prin centrifugare timp de 3 minute la 15 000 g (sau, alternativ, timp de 10 minute la 15 000 g la o temperatură de 4 °C). Dacă se dorește, procentul de hematocrit poate fi determinat în urma centrifugării. Plasma este apoi extrasă din tubul microhematocrit și depozitată într-un tub de centrifugare cu 0,13 unități de aprotinină (un inhibitor de protează) la o temperatură de – 80 °C până când poate fi determinată vitelogenina. În funcție de dimensiunea *Pimephales promelas* (care depinde de sex), volumele de plasmă care pot fi prelevate sunt cuprinse între 5 și 60 de microlitri per pește (Jensen *et al.* 2001).

**Procedura 1B: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din inimă**

Alternativ, sângele poate fi prelevat și printr-o puncție cardiacă realizată cu ajutorul unei seringi heparinizate (1 000 de unități de heparină/ml). Sângele este transferat în tuburi Eppendorf (ținute în gheață) și apoi centrifugat (5 minute, 7 000 g, la temperatura camerei). Plasma trebuie transferată în tuburi Eppendorf curate (în alicote, dacă volumul de plasmă permite acest lucru) și congelată rapid la – 80 °C până ce este analizată (Panter *et al.*, 1998).

**Procedura 2A: *Oryzias latipes*, excizie a ficatului**

Extragerea peștilor pentru testare din camera de testare

- (1) Peștii pentru testare trebuie scoși din camera de testare cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni. Se procedează cu grijă pentru a nu scăpa peștii pentru testare în alte camere de testare.
- (2) În principiu, peștii pentru testare trebuie să fie scoși în următoarea ordine: din vasul de control, vasul de control cu solvent (dacă este cazul), vasul cu cea mai mică concentrație, vasul cu concentrația medie, vasul cu cea mai mare concentrație și vasul de control pozitiv. În plus, trebuie extrași toți masculii dintr-o cameră de testare înainte de extragerea femelelor rămase.
- (3) Sexul fiecărui pește pentru testare este identificat pe baza caracteristicilor sexuale secundare externe (de exemplu, forma înotoarei anale).
- (4) Se așează peștii pentru testare într-un container de transport și se transportă la stația de lucru pentru excizia ficatului. Se verifică etichetele camerei de testare și containerul de transport pentru precizie și pentru a confirma faptul că numărul peștilor scoși din camera de testare și numărul peștilor rămași în camera de testare sunt conforme celor preconizate.
- (5) În cazul în care sexul nu poate fi stabilit pe baza aspectului exterior al peștelui, se îndepărtează toți peștii din camera de testare. În acest caz, sexul este identificat prin observarea gonadei sau a caracteristicilor sexuale secundare cu ajutorul unui microscop stereoscopic.

**▼ M6**

## Excizia ficatului

- (1) S transferă peștii pentru testare din containerul de transport în soluția anestezică cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni.
- (2) După anestezierea peștilor pentru testare, ei sunt transferați pe o hârtie de filtru (sau pe un șervet de hârtie) cu ajutorul unei pensete (obișnuite). Când se prind peștii pentru testare, se aplică brațele pensetei de o parte și de alta a capului pentru a evita ruperea cozii.
- (3) Se șterge apa de pe suprafața peștilor pentru testare cu o hârtie de filtru (sau cu un șervet de hârtie).
- (4) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se efectuează apoi o mică incizie transversală între zona ventrală a gâtului și zona de mijloc a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci de disecție.
- (5) Se introduce foarfeca de disecție în incizia mică și se efectuează o incizie de-a lungul liniei mediane a abdomenului, de la un punct caudal la mantaua branhială până la partea craniană a anusului. Se procedează cu grijă pentru a nu se introduce foarfeca de disecție prea adânc evitându-se astfel distrugerea ficatului și a gonadei.
- (6) Se efectuează următoarele operațiuni la un microscop stereoscopic.
- (7) Se așează peștele pentru testare cu abdomenul în sus pe un șervet de hârtie (se află la dispoziție și o placă Petri din sticlă sau o lamelă din sticlă).
- (8) Se îndepărtează pereții cavității abdominale cu ajutorul unei pensete de precizie și se exteriorizează organele interne. Dacă este necesar, organele interne pot fi exteriorizate și prin înlăturarea unei părți a peretelui cavității abdominale.
- (9) Se expune porțiunea care leagă ficatul de vezica biliară cu ajutorul unei alte pensete de precizie. Se prinde apoi canalul biliar și se excizează vezicula biliară. Se procedează cu grijă pentru a nu leza vezicula biliară.
- (10) Se prinde esofagul și se separă prin excizare tractul gastrointestinal de ficat în același mod. Se procedează cu grijă pentru a nu vărsa conținutul tractului gastrointestinal. Se separă prin excizare tractul gastrointestinal caudal de anus și se îndepărtează tractul din cavitatea abdominală.
- (11) Se taie masa de grăsime și alte țesuturi de la periferia ficatului. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria ficatul.
- (12) Se prinde zona portală hepatică cu ajutorul pensetei de precizie și se extrage ficatul din cavitatea abdominală.
- (13) Se așează ficatul pe o lamelă din sticlă. Cu ajutorul pensetei de precizie, se îndepărtează grăsimea și alte țesuturi (de exemplu, mucoasă abdominală), dacă este necesar, de pe suprafața ficatului.
- (14) Se cântărește ficatul cu ajutorul unei balanțe analitice electronice, utilizând ca tară un microtub de 1,5 ml. Se înregistrează valoarea pe fișa de lucru (citire: 0,1 mg). Se confirmă informațiile de identificare pe eticheta microtubului.
- (15) Se închide capacul microtubului care conține ficatul. Se depozitează într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).
- (16) După excizia unui ficat, se curăță instrumentele de disecție sau se înlocuiesc cu unele curate.

**▼ M6**

(17) Se excizează ficații de la toți peștii din containerul de transport conform descrierii de mai sus.

(18) După excizarea ficaților de la toți peștii din containerul de transport (adică, toți masculii sau toate femelele dintr-o cameră de testare), se așează toate eșantioanele de ficat pe un stativ pentru tuburi prevăzute cu o etichetă de identificare și se depozitează într-un congelator. Atunci când ficații sunt donați pentru pretratament la scurt timp după excizie, eșantioanele sunt transportate la stația de lucru următoare într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).

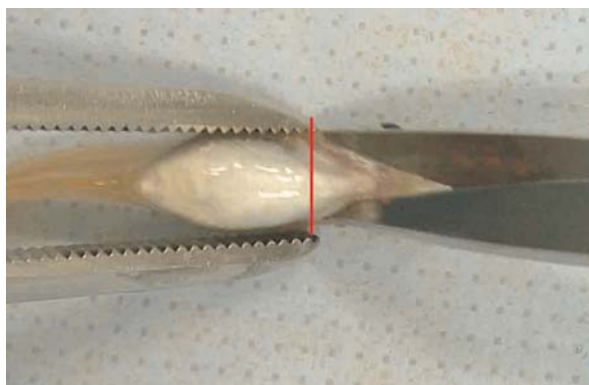
După excizia ficatului, carcasa peștelui este disponibilă pentru măsurarea caracteristicilor sexuale secundare.

**Eșantion**

Se depozitează eșantioanele de ficat prelevate de la pești la temperatura de  $\leq -70$  °C în cazul în care nu sunt utilizate pentru pretratament la scurt timp după excizie.

*Fig-1*

Se efectuează o incizie în partea anterioară a înotătoarelor pectorale cu ajutorul unei foarfeci.



*Fig-2*

Se efectuează o incizie pe linia mediană a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci spre un punct situat la aproximativ 2 mm cranial față de anus.

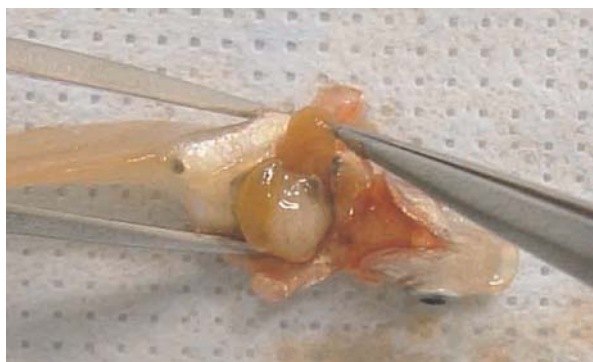


**▼ M6***Fig-3*

Pereții abdominali sunt îndepărtați cu ajutorul unui forceps pentru a expune ficatul și celelalte organe interne. (Alternativ, pereții abdominali pot fi fixați cu ace lateral).

*Fig-4*

Ficatul este disecat și excizat cu ajutorul unui forceps.

*Fig-5*

Intestinele sunt retrase ușor cu ajutorul unui forceps.



▼ **M6***Fig-6*

Ambele capete ale intestinelor și toate elementele mezenterice atașate sunt secționate cu ajutorul unei foarfeci.

*Fig-7 (femelă)*

Procedura este identică în cazul femelei.

*Fig-8*

Procedura încheiată.



**Procedura 2\_B: *Oryzias latipes*, pretratament a ficatului pentru măsurarea vitelogeninei**

Se ia flaconul cu tamponul de omogenat din trusa ELISA și se răcește în bucăți de gheață (temperatura soluției:  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ). În cazul în care se utilizează un tampon de omogenat din sistemul EnBio ELISA, se decongelează soluția până ajunge la temperatura camerei și apoi se răcește flaconul în bucăți de gheață.



**▼ M6**

Se calculează volumul tamponului de omogenat pentru ficat pe baza greutateii sale (se adaugă 50 µl de tampon de omogenat per mg de ficat pentru omogenat). De exemplu, în cazul în care greutatea ficatului este de 4,5 mg, volumul tamponului de omogenat pentru ficat este de 225 µl. Se întocmeşte o listă a volumelor de tampon de omogenat pentru toţi ficatii.

Se pregăteşte ficatul pentru pretratament.

- (1) Se scoate de la congelator microtubul de 1,5 ml care conţine ficatul chiar înainte de pretratament.
- (2) Pretratamentul ficatului de la masculi trebuie realizat înaintea celui al femelelor pentru a evita contaminarea cu vitelogenină. În plus, pretratamentul pentru grupele de testare trebuie realizat în următoarea ordine: control, control cu solvent (dacă este cazul), cea mai mică concentraţie, concentraţie medie, cea mai mare concentraţie şi control pozitiv.
- (3) Numărul microtuburilor de 1,5 ml care conţin probe de ficat scoase din congelator la un moment dat nu trebuie să depăşească numărul care poate fi centrifugat în acel moment.
- (4) Se aranjează microtuburile de 1,5 ml care conţin probe de ficat pe stativul cu gheaţă în ordinea numerotării eşantioanelor (nu este necesară decongelarea ficatului).

Efectuarea pretratamentului

1. Adăugarea tamponului de omogenizare

- (1) Se verifică lista pentru a se identifica volumul de tampon de omogenat care trebuie utilizat pentru o anumită probă de ficat şi se ajustează micropipeta (intervalul de volume: 100-1 000 µl) până la volumul adecvat. Se montează un vârf curat la micropipetă.
- (2) Se extrage tamponul de omogenat din flaconul cu reactiv şi se adaugă tamponul în microtubul de 1,5 ml care conţine ficatul.
- (3) Se adaugă tamponul de omogenat în toate microtuburile de 1,5 ml care conţin ficat conform procedurii descrise mai sus. Nu este necesară schimbarea vârfului micropipetei cu unul nou. Cu toate acestea, în cazul în care vârful este contaminat sau este suspectat a fi contaminat, acesta trebuie schimbat.

2. Omogenizarea ficatului

- (1) Se ataşează un nou pistil pentru omogenizare la omogenizatorul microtubului.
- (2) Se introduce pistilul în microtubul de 1,5 ml. Se utilizează omogenizatorul microtubului pentru a presa ficatul între suprafaţa pistilului şi peretele intern al microtubului de 1,5 ml.
- (3) Se lasă omogenizatorul microtubului să funcţioneze 10-20 de secunde. Se răceşte microtubul de 1,5 ml cu ajutorul unor bucăţi de gheaţă pe parcursul operaţiunii.
- (4) Se scoate pistilul din microtubul de 1,5 ml şi se lasă deoparte aproximativ 10 secunde. Se efectuează apoi un control vizual al stării suspensiei.
- (5) Dacă bucăţile de ficat sunt observate în suspensie, se repetă operaţiunile (3) şi (4) pentru a pregăti în mod satisfăcător omogenatul de ficat.



**▼ M6**

(6) Se răcește omogenatul de ficat în suspensie pe stativul cu gheață până în momentul centrifugării.

(7) Se schimbă pistilul cu unul nou pentru fiecare omogenat.

(8) Se omogenizează toți ficații cu tampon de omogenat conform procedurii descrise mai sus.

### 3. Centrifugarea omogenatului de ficat în suspensie

(1) Se fixează temperatura camerei centrifugii frigorifice la  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ .

(2) Se introduc microtuburile de 1,5 ml care conțin omogenatul de ficat în suspensie în centrifuga frigorifică (se ajustează dacă este necesar).

(3) Se centrifughează omogenatul de ficat în suspensie la 13 000 g timp de 10 min la  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . Totuși, dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat, forța și timpul de centrifugare pot fi ajustate după necesități.

(4) După centrifugare, se verifică dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat (suprafață: lipide, intermediar: supernatant, strat inferior: țesut hepatic). Dacă separarea nu este adecvată, se centrifughează suspensia din nou în aceleași condiții.

(5) Se elimină toate probele din centrifuga frigorifică și se aranjează în ordinea numerotării eșantioanelor pe stativul cu gheață. Se procedează cu atenție pentru a nu resuspenda fiecare strat separat după centrifugare.

### 4. Colectarea supernatantului

(1) Se așează patru microtuburi de 0,5 ml pentru depozitarea supernatantului în stativul pentru tuburi.

(2) Se colectează 30  $\mu\text{l}$  din fiecare supernatant (separat ca strat intermediar) cu micropipeta și se introduce într-un microtub de 0,5 ml. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

(3) Se colectează supernatantul și se introduce în celelalte două microtuburi de 0,5 ml în același mod ca cel descris mai sus.

(4) Se colectează restul supernatantului cu micropipeta (dacă este fezabil:  $\geq 100 \mu\text{l}$ ). Se introduce apoi supernatantul în microtubul de 0,5 ml rămas. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

(5) Se închide dopul microtubului de 0,5 ml și se notează volumul supernatantului pe etichetă. Apoi se răcesc imediat microtuburile pe stativul cu gheață.

(6) Se schimbă vârful micropipetei cu unul nou pentru fiecare supernatant. În cazul în care o cantitate mare de lipide se lipește de vârf, se schimbă imediat cu unul nou pentru a evita contaminarea extractului de ficat cu grăsime.

(7) Se repartizează întregul supernatant centrifugat în patru microtuburi de 0,5 ml în conformitate cu procedura descrisă mai sus.

**▼ M6**

(8) După aceasta, toate se așează pe stativul pentru tuburi cu eticheta de identificare și apoi se introduc imediat în congelator. În cazul în care concentrațiile de VTG sunt măsurate imediat după pretratament, un microtub de 0,5 ml (conținând 30  $\mu$ l de supernatant) se păstrează la rece în stativul pentru tuburi și se transferă în stația de lucru unde se realizează testul ELISA. În acest caz, se așează microtuburile rămase în stativele pentru tuburi și se introduc în congelator.

(9) După colectarea supernatantului, se elimină reziduurile în mod corespunzător.

**Depozitarea eșantioanelor**

Microtuburile de 0,5 ml conținând supernatantul omogenatului de ficat se depozitează la temperatura  $\leq -70$  °C până în momentul utilizării acestora în cadrul testului ELISA..

**Procedura 3 A: Peștele-zebră, prelevare de sânge din vena/artera caudală**

Imediat după anestezie, se secționează transversal pedunculul caudal și se prelevează probe de sânge din artera/vena caudală cu ajutorul unui tub capilar microhematocrit heparinizat. Volumele de sânge variază de la 5 la 15  $\mu$ l în funcție de dimensiunile peștilor. În tubul microcapilar se adaugă un volum egal de tampon de aprotinină (6  $\mu$ g/ml în PBS), iar plasma este separată de sânge prin centrifugare (5 minute la 600 g). Plasma este colectată în tuburi de testare și depozitată la o temperatură de  $-20$  °C până în momentul măsurării vitelogeninei sau a altor proteine care prezintă interes.

**Procedura 3 B: Peștele-zebră, prelevare de sânge prin puncție cardiacă**

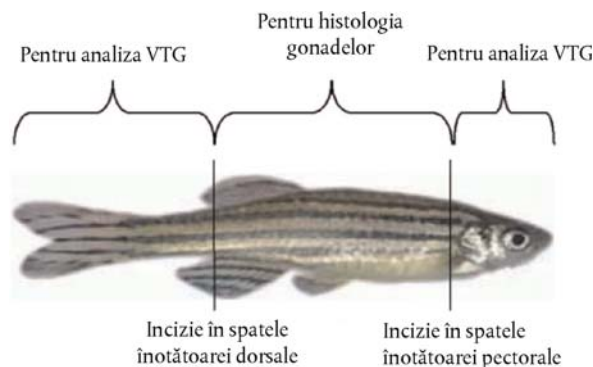
Pentru a se evita coagularea sângelui și degradarea proteinelor, probele sunt colectate într-o soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) conținând heparină (1 000 unități/ml) și aprotinină – inhibitoare de protează (2 TIU/ml). Ca ingrediente pentru tampon se recomandă, sare de amoniu a heparinei și aprotinină liofilizată. Pentru prelevarea de probe de sânge se recomandă utilizarea unei seringi (1 ml) cu un ac subțire fix (de exemplu, Braun Omnican-F). Seringa trebuie preumplută cu tampon (aproximativ 100  $\mu$ l) pentru a realiza o eluare completă a volumelor sanguine mici de la fiecare pește. Probele de sânge sunt prelevate prin puncție cardiacă. Peștele trebuie anesteziat în prealabil cu MS-222 (100 mg/l). Un plan de anestezie corespunzător este acela care permite utilizatorului să distingă bătăile inimii peștelui-zebră. În timpul efectuării puncției cardiace, aplicați o tensiune ușoară continuă pe pistonul seringii. Volumele sanguine care pot fi colectate se încadrează în intervalul 20-40 de microlitri. După efectuarea puncției cardiace, amestecul de sânge și soluție tamponată trebuie introdus într-un tub de testare. Plasma este separată de sânge prin centrifugare (20 de minute; 5 000 g) și trebuie depozitată la o temperatură de  $-80$  °C până în momentul efectuării analizei.

**Procedura 3C: POS: Peștele-zebră, omogenizarea capului și a cozii**

(1) Peștii sunt anesteziați și eutanasiați conform descrierii testului.

(2) Capul și coada peștelui sunt tăiate conform Figurii 1.

Important: Toate instrumentele de disecție și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu vitelogenină” de la femele sau de la masculii induși la masculii neinduși.

▼ **M6***Figura 1*

- (3) Greutatea materialului conținând cap și coadă de la fiecare pește este măsurată, rotunjindu-se greutatea la cea mai apropiată cifră întreagă în mg.
- (4) După cântărire, părțile sunt introduse în tuburi corespunzătoare (de exemplu, 1,5 ml Eppendorf) și congelate la o temperatură de  $-80^{\circ}\text{C}$  până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață, iar rezultatul este o masă omogenă). Important: Tuburile trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de trup corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor.
- (5) Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă tampon de omogenizare(\*) la temperatura gheții în greutate  $4 \times$  greutatea țesutului. Se continuă operațiunea cu ajutorul pistilurilor până ce amestecul devin omogen. Notă importantă: se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.
- (6) Probele se plasează pe gheață până la centrifugare, care se realizează la  $4^{\circ}\text{C}$  la  $50\,000 \times g$  timp de 30 min.
- (7) Se utilizează o pipetă pentru a repartiza câte 20  $\mu\text{l}$  de supernatant în cel puțin două tuburi introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără nicio fracțiune de grăsime sau de granule.
- (8) Tuburile se depozitează la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la utilizare.

(\*) **Tampon de omogenizare:**

- [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120  $\mu\text{l}$  amestec de inhibitori de protează.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), de exemplu de la Bie & Berntsen, Danemarca.
- Amestec de inhibitori de protează: de la Sigma (pentru țesut de mamifer) Numărul produsului P 8340.
- *Notă:* tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării.

**▼ M6***Apendicele 7***Probe fortificate de vitelogenină și standard de referință interteste**

De fiecare dată când sunt efectuate teste de măsurare a vitelogeninei, va fi analizată o probă fortificată obținută cu ajutorul unui standard de referință interteste. Vitelogenina utilizată pentru prepararea standardului de referință interteste va proveni de la un lot diferit de cel utilizat pentru prepararea standardelor de calibrare pentru testul care urmează să fie realizat.

Proba fortificată va fi preparată prin adăugarea unei cantități cunoscute de standard interteste la o probă de plasmă de mascul de control. Proba va fi fortificată pentru a obține o concentrație de vitelogenină între de 10 și de 100 de ori mai mare față de concentrația de vitelogenină preconizată pentru peștii masculi de control. Proba de plasmă de masculi de control care este fortificată poate proveni de la un singur pește sau poate fi un amestec de la mai mulți pești.

Un subșantion de plasmă nefortificată de mascul de control va fi analizat în cel puțin două godeuri duplicat. Proba fortificată va fi, de asemenea, analizată în cel puțin două godeuri duplicat. Cantitatea medie de vitelogenină din cele două probe de plasmă nefortificate de mascul de control va fi adăugată la cantitatea calculată de vitelogenină adăugată la probele fortificate în vederea determinării concentrației preconizate. Raportul dintre respectiva concentrație preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.



## ▼ M6

## C.38. TEST DE METAMORFOZĂ LA AMFIBIENI

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 231 (2009). Necesitatea creării și validării unui test care să aibă capacitatea de a detecta substanțele chimice active asupra sistemului tiroidian al speciilor vertebrate reprezintă o consecință a temerilor conform cărora concentrațiile din mediu ale substanțelor chimice pot cauza efecte adverse atât oamenilor, cât și faunei. În 1998, OCDE a inițiat o activitate, cu prioritate mare, de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări vizând screeningul și testarea unor factori perturbatori potențiali ai sistemului endocrin. Un element al activității a constat în dezvoltarea unei orientări vizând screeningul substanțelor active asupra sistemului tiroidian al speciilor vertebrate. Au fost propuse atât o variantă perfecționată a studiului toxicității orale, cu doze repetate, cu durată de 28 de zile, la rozătoare (capitolul B.7 din prezenta anexă) și testul de metamorfoză la amfibieni (*Amphibian Metamorphosis Assay* – AMA). Metoda de testare B.7 în varianta ei perfecționată a fost supusă validării și a fost emisă o metodă de testare revizuită. Testul de metamorfoză la amfibieni (AMA) a făcut obiectul unui amplu program de validare care a inclus studii intra- și interlaboratoare demonstrând relevanța și fiabilitatea testului (1, 2). Ulterior, validarea testului a făcut obiectul unei evaluări *inter pares* efectuate de un grup de experți independenți (3). Această metodă de testare reprezintă rezultatul experienței dobândite pe parcursul studiilor de validare pentru detectarea substanțelor chimice active asupra sistemului tiroidian și al activității desfășurate în alte părți, în țările membre ale OCDE.

## PRINCIPIUL TESTULUI

2. Testul de metamorfoză la amfibieni (AMA) este un test de screening care are ca obiectiv identificarea pe bază empirică a substanțelor chimice care pot interfera cu funcționarea normală a axului hipotalamo-hipofizo-tiroidian (HHT). AMA reprezintă un model generalizat pentru vertebrate în măsura în care se bazează pe structurile și funcțiile conservate ale axului HHT. Acesta este un test important deoarece metamorfoza la amfibieni oferă un proces bine studiat, dependent de tiroidă, care răspunde la substanțele chimice active din axul HHT, fiind singurul test în măsură să detecteze activitatea tiroidiană la animalele care sunt în cursul unei dezvoltări morfologice.
3. Protocolul experimental general implică expunerea mormolocilor de *Xenopus laevis* aflați în stadiul 51 la minimum trei concentrații diferite ale unei substanței chimice testate și la un control reprezentat de apa diluată, timp de 21 de zile. Există patru replici ale fiecărui tratament de testare. Densitatea larvară la inițierea testului este de 20 de mormoloci per bazin de testare pentru toate grupele tratate. Parametrii studiați observați sunt lungimea membrelor posterioare, lungimea bot-cloacă (*snout to vent length* – SVL), stadiul de dezvoltare, greutatea umedă, histologia tiroidiană și observațiile zilnice ale mortalității.

## DESCRIEREA METODEI

## Speciile folosite pentru testare

4. *Xenopus laevis* este crescut în mod uzual în condiții de laborator în întreaga lume, fiind ușor de obținut prin intermediul furnizorilor comerciali. Reproducerea poate fi indusă cu ușurință în cazul acestei specii pe parcursul întregului an utilizând injecții cu gonadotropină corionică umană (*human chorionic gonadotropin* – HCG), larvele rezultate putând fi crescute ușor până la stadii de dezvoltare selectate, în număr mare,

**▼ M6**

pentru a permite utilizarea de protocoale de testare specifice stadiilor. Este de preferat ca larvele utilizate în test să derive din adulți crescuți în propriul laborator. Ca alternativă, deși nu este procedura preferată, ouăle sau embrionii pot fi expediați la laboratorul care efectuează testul, unde li se permite aclimatizarea; expedierea organismelor în stadiu de larvă în scopuri de testare nu este acceptabilă.

**Echipament și materiale**

5. Următoarele echipamente și materiale sunt necesare pentru realizarea acestui test:

- a) Sistem de expunere (a se vedea descrierea de mai jos);
- b) Acvarii din sticlă sau din oțel inoxidabil (a se vedea descrierea de mai jos);
- c) Bazine de reproducere;
- d) Aparat de controlare a temperaturii [de exemplu aparate de încălzire sau aparate de răcire (ajustabile la  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )];
- e) Termometru;
- f) Microscop de disecție binocular;
- g) Cameră digitală cu o rezoluție de cel puțin 4 megapixeli și cu funcție micro;
- h) Software pentru digitalizarea de imagini;
- i) Placă Petri (ex.  $100 \times 15 \text{ mm}$ ) sau o cameră transparentă din plastic de dimensiuni comparabile;
- j) Balanță analitică capabilă să măsoare greutatea cu 3 zecimale (mg);
- k) Aparat pentru măsurarea oxigenului dizolvat;
- l) pH-metru;
- m) Aparat pentru măsurat intensitatea luminii în unități lux;
- n) Diverse vase din sticlă și instrumente de laborator;
- o) Pipete ajustabile ( $10 - 5\,000 \mu\text{l}$ ) sau pipete asortate de dimensiuni echivalente;
- p) Substanță chimică utilizată în testare, în cantități suficiente pentru realizarea studiului, de preferat dintr-un singur lot;
- q) Instrumente analitice corespunzătoare pentru substanța chimică utilizată în testare sau servicii analitice contractate.

**Posibilitatea ca substanța chimică să fie utilizată în test**

6. AMA se bazează pe un protocol de expunere în mediu acvatic, în cadrul căruia substanța chimică este introdusă în incintele de testare prin intermediul unui sistem de testare cu flux continuu. Cu toate acestea, metodele de testare cu flux continuu sunt supuse unor constrângeri legate de tipul substanțelor chimice care pot fi testate, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Prin urmare, înainte de utilizarea acestui protocol, este necesară obținerea de informații de referință privind substanța chimică în cauză pentru a determina posibilitatea ca substanța chimică să fie utilizată în test, precum și consultarea publicației „*OECD Guidance Document on*

## ▼ M6

*Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*” (Document de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile ) (4). Caracteristicile care indică faptul că substanța chimică poate fi dificil de testat în sisteme acvatice includ: coeficienții de partiționare apă/octanol ( $\log K_{ow}$ ) mari, volatilitate mare, susceptibilitatea la hidroliză și la fotoliză în condiții de iluminat de laborator. De asemenea, alți factori pot fi relevanți pentru determinarea posibilității ca substanța chimică să fie utilizată în test, iar aceștia trebuie determinați pentru fiecare caz în parte. Dacă utilizarea unui sistem de testare cu flux continuu nu permite succesul în testarea substanței chimice, este posibil să se recurgă la un sistem static cu reînnoire. În cazul în care niciunul dintre sisteme nu este adaptat pentru substanța chimică testată, atunci aceasta nu se testează prin acest protocol.

### Sistemul de expunere

7. Un sistem de diluție cu flux continuu este preferabil, dacă este posibil, unui sistem static cu reînnoire. Dacă proprietățile fizice și/sau chimice ale oricăreia dintre substanțele chimice nu permit utilizarea unui sistem de diluție cu flux continuu, se poate utiliza un sistem de expunere alternativ (de exemplu, static cu reînnoire). Componentele sistemului trebuie să fie fabricate dintr-un material adaptat pentru contactul cu apa, precum sticla, oțelul inoxidabil și/sau politetrafluoretilena. Cu toate acestea, pot fi utilizate materiale plastice corespunzătoare dacă acestea nu compromit studiul. Bazinele de expunere trebuie să fie acvarii din sticlă sau oțel inoxidabil, prevăzute cu conducte verticale care să mențină volumul aproximativ al bazinului între 4 și 10 l și o adâncime minimă a apei de 10 – 15 cm. Sistemul trebuie să aibă capacitatea de a susține toate concentrațiile de expunere și un control, cu patru replici per tratament. Debitul fiecărui bazin trebuie să fie constant, luând în considerare menținerea condițiilor biologice și expunerea la substanța chimică (ex. 25 ml/min). Bazinele de tratament trebuie să fie dispuse aleator într-o anumită poziție în cadrul sistemului de expunere, pentru a reduce eventualele efecte legate de poziție, inclusiv variațiile ușoare ale temperaturii, intensității luminii etc. Iluminarea fluorescentă trebuie să fie utilizată pentru a asigura o perioadă de expunere la lumină de 12 h de lumină: 12 h de întuneric la o intensitate cuprinsă între 600 și 2 000 lux ( $\text{lumen/m}^2$ ) la suprafața apei. În fiecare bazin de testare, temperatura apei trebuie menținută la  $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ , pH-ul trebuie menținut la valori cuprinse între 6,5 și 8,5, iar concentrația oxigenului dizolvat (OD) la  $> 3,5 \text{ mg/l}$  ( $> 40\%$  din saturația în aer). Ca o condiție minimă, temperatura apei, pH-ul și oxigenul dizolvat trebuie măsurate săptămânal; temperatura trebuie să fie măsurată, de preferință, în mod continuu în cel puțin unul dintre vasele de testare. Apendicele 1 schițează condițiile experimentale necesare executării protocolului. Pentru informații suplimentare privind instalare sistemelor de expunere cu flux continuu și/sau a celor statice cu reînnoire, a se consulta ghidul ASTM „*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*” (Orientare-standard privind efectuarea testelor de toxicitate acută cu materiale de testare pe pești, macronevertebrate și amfibieni) (5) și testele de toxicologie acvatică generale.

### Calitatea apei

8. Poate fi utilizată orice apă disponibilă local (apa de izvor sau apa de la robinet filtrată cu filtru de carbon) și care permite creșterea și dezvoltarea normale ale mormolocilor de *X. laevis*. Întrucât calitatea apei locale poate varia în mod semnificativ de la o zonă la alta, trebuie efectuată o analiză a calității apei, în special dacă nu sunt disponibile date istorice privind utilitatea respectivei ape pentru creșterea de *Xenopus*. O atenție specială trebuie acordată confirmării absenței din apă a cuprului, a clorului și a cloraminelor, toate acestea fiind toxice pentru broaște și mormoloci. În plus, se recomandă să se analizeze apa în ceea ce privește concentrațiile



▼ **M6**

de fond de fluoruri, perclorați și clorați (subproduse rezultate din dezinfectarea apei potabile), întrucât toți acești anioni sunt substraturi ale transportatorului iodului la glanda tiroidă, iar nivelurile ridicate ale acestora pot perturba rezultatele studiului. Analiza trebuie să fie efectuată înainte de începerea testării, iar apa de testare trebuie în mod normal să nu conțină acești anioni.

*Concentrația de ioduri din apa de testare*

9. Sinteza hormonilor tiroidieni în glanda tiroidă se bazează pe cantități suficiente de ioduri aflate la dispoziția larvelor, din surse acvatice și alimentare. În prezent, nu există recomandări empirice privind concentrațiile de ioduri minime. Cu toate acestea, cantitățile de ioduri disponibile pot afecta reactivitatea sistemului tiroidian la agenții activi asupra tiroidei, un factor de altfel cunoscut ca influențând activitatea bazală a acestor glande, un aspect care trebuie luat în considerare în momentul interpretării rezultatelor histopatologiei tiroidei. Prin urmare, trebuie raportate concentrațiile de ioduri măsurate în apa utilizată pentru testare. Pe baza datelor disponibile provenind din studiile de validare, s-a demonstrat că protocolul funcționează bine atunci când concentrațiile de ioduri ( $I^-$ ) din apa de testare au fost situate între 0,5 și 10  $\mu\text{g/l}$ . În mod ideal, concentrația minimă de ioduri din apa de testare trebuie să fie de 0,5  $\mu\text{g/l}$ . Dacă testul este efectuat cu apă deionizată, pentru a atinge această concentrație minimă de 0,5  $\mu\text{g/l}$  este necesară suplimentare cu iod. Orice altă suplimentare a apei de testare cu iod sau cu alte săruri trebuie notată în raport.

### **Îngrijirea animalelor**

*Îngrijirea și reproducerea animalelor adulte*

10. Îngrijirea și reproducerea animalelor adulte este realizată în conformitate cu orientările standard, iar pentru informații mai detaliate, cititorul este invitat să consulte orientările standard privind efectuarea testului intitulat „Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)” (Testul de teratogeneză la embrionii de broască) (6). Aceste orientări standard oferă un exemplu de metode de îngrijire și de reproducere adecvate, însă fără să fie necesară respectarea lor cu strictețe. Pentru a induce reproducerea, mai multe cupluri (3 – 5) de adulți, femele și masculi, sunt injectate cu gonadotropină corionică umană (HCG). Dozele injectate femelelor și masculilor sunt de aproximativ 800 IU – 1 000 IU și, respectiv, la 600 IU – 800 IU de HCG dizolvată într-o soluție salină de 0,6 – 0,9 %. Cuplurile reproducătoare sunt ținute în bazine de mari dimensiuni, ferite de perturbări și în condiții statice, în vederea promovării amplexusului. Fundul fiecărui bazin de reproducere este prevăzut cu un grilaj din plastic sau din oțel inoxidabil, care să permită maselor de ouă să cadă pe fundul bazinului. Broaștele injectate după-amiaza târziu vor depune, de obicei, cea mai mare parte a ouălor pe la jumătatea dimineții zilei următoare. După ce o cantitate suficientă de ouă sunt eliberate și fertilizate, adulții trebuie să fie îndepărtați din bazinele de reproducere.

*Îngrijirea și selectarea larvelor*

11. După ce adulții sunt îndepărtați din bazinele de reproducere, ouăle sunt colectate și evaluate din punctul de vedere al viabilității lor, utilizându-se un subset de embrioni prelevați din toate bazinele de reproducere. Cele mai bune progenituri (2 – 3 sunt recomandate pentru evaluarea calității lor) trebuie reținute pe baza viabilității embrionilor și a prezenței unui număr adecvat (minimum 1 500) de embrioni. Toate organismele utilizate în cadrul unui studiu trebuie să provină dintr-un singur eveniment de reproducere (progeniturile nu trebuie amestecate). Embrionii sunt transferați într-un recipient sau vas mare și plat și toate ouăle vizibil moarte sau anormale [a se vedea definiția de la (5)] sunt îndepărtate cu ajutorul unei pipete sau al unei pipete oculare. Embrionii sănătoși rezultați din

## ▼ M6

fiecare set de progenituri sunt transferați în trei bazine de eclozare separate. La patru zile după transferare în bazinele de eclozare se selectează, pe baza viabilității și a succesului eclozării, cele mai bune progenituri, iar larvele sunt transferate într-un număr corespunzător de bazine de creștere la  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . În plus, alte larve sunt mutate în bazine suplimentare pentru a servi ca înlocuitori în caz de mortalitate în bazinele de creștere pe parcursul primei săptămâni. Această procedură menține o densitate constantă de organisme, ceea ce reduce divergența dezvoltării în cohorta provenită dintr-un singur eveniment de reproducere. Toate bazinele de creștere trebuie să fie curățate zilnic. Ca măsură de precauție, mănușile de vinil sau de nitril sunt preferabile mănușilor din latex. Organismele moarte trebuie să fie îndepărtate zilnic și înlocuite cu larve pentru a menține astfel densitatea organismelor la un nivel constant pe parcursul primei săptămâni. Larvele trebuie hrănite cel puțin de două ori pe zi.

12. Pe parcursul etapei de preexpunere, mormolocii sunt aclimatizați la condițiile corespunzătoare etapei de expunere, inclusiv la tipul de hrană, la temperatură, la ciclul lumină-întuneric și la mediul de cultură. Prin urmare, se recomandă ca aceeași apă de cultură/diluție să fie utilizată pe parcursul etapei de preexpunere și al celei de expunere. Dacă un sistem de cultură static este utilizat pentru menținerea mormolocilor pe durata etapei de preexpunere, mediul de cultură trebuie să fie înlocuit complet cel puțin de două ori pe săptămână. Suprapopularea, cauzată de densități mari de larve din cursul etapei de preexpunere, trebuie evitată deoarece un astfel de fenomen ar putea afecta în mod semnificativ dezvoltarea mormolocilor în cursul fazei de testare care urmează. Prin urmare, densitatea din bazinul de creștere nu trebuie să depășească aproximativ patru mormoloci/l de mediu de cultură (sistem de expunere statică) sau 10 mormoloci/l de mediu de cultură (de exemplu, cu un debit de 50 ml/min în sistemul de cultură sau de preexpunere). În aceste condiții, mormolocii trebuie să se dezvolte de la stadiul 45/46 la stadiul 51 în doisprezece zile. Mormolocii reprezentativi ai acestei populații trebuie inspectați zilnic pentru a observa stadiul de dezvoltare în vederea estimării timpului corespunzător pentru începerea expunerii. Trebuie procedat cu atenție pentru a minimaliza stresul și traumele pentru mormoloci, în special în timpul mobilizării, al curățării acvariiilor și al manipulării larvelor. Condițiile/activitățile stresante trebuie evitate, în special zgomotele puternice și/sau constante, vibrațiile și lovirea acvariiilor, activitatea excesivă în laborator și modificări rapide ale mediului (lumina, temperatura, pH-ul, OD, debitul apei, etc.). Dacă mormolocii nu ajung în stadiul 51 în decurs de 17 zile de la fertilizare, stresul excesiv trebuie considerat ca fiind una dintre cauze.

*Cultura și hrănirea larvelor*

13. Mormolocii sunt hrăniți de exemplu cu hrană comercială pentru mormoloci utilizată în studiile de validare (a se vedea, de asemenea, apendicele 1) pe parcursul etapei de preexpunere [conform stadiului Nieuwkoop și Faber (NF) 45/46 (8)] și pe parcursul întregii perioade de testare de 21 de zile sau cu alt tip de hrană care a demonstrat aceeași performanță în cadrul testului de metamorfoză la amfibieni. Regimul de hrănire pe parcursul perioadei de preexpunere trebuie să fie ajutat cu atenție pentru a îndeplini necesitățile mormolocilor în dezvoltare. În practică, de mai multe ori pe zi (de cel puțin două ori), porții mici de hrană trebuie administrate larvelor recent eclozate. Hrănirea în exces trebuie evitată în vederea *i)* menținerii calității apei și *ii)* a prevenirii depunerii pe filtrelor branhiilor de particule și resturi de hrană. În ceea ce privește hrana administrată mormolocilor în studiile de validare, porțiile zilnice trebuie crescute pe măsura creșterii mormolocilor până la atingerea unei cantități de aproximativ 30 mg/animal/zi cu puțin timp înainte de începerea testului. În studiile de validare s-a demonstrat că hrana disponibilă

▼ **M6**

comercial susține creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a mormolocilor de *X. laevis* și că este o masă de particule fine care rămân suspendate în coloana de apă timp îndelungat și sunt îndepărtate odată cu fluxul apei. Prin urmare, volumul zilnic total de hrană trebuie împărțit în porții mai mici și administrate zilnic de cel puțin două ori. Pentru acest tip de hrană, regimul de hrănire este prezentat în tabelul 1. Ritmul de hrănire trebuie înregistrat. Acest tip de hrană poate fi administrat sub formă uscată sau sub formă de soluție stoc pregătită în apă de diluție. O astfel de soluție stoc trebuie pregătită proaspăt la un interval de două zile și depozitată la 4 °C atunci când nu este utilizată.

Tabelul 1

**Regimul de hrănire cu hrană comercială pentru mormoloci utilizată în studiile de validare pentru mormolocii de *X. laevis* în etapa în care animalele sunt în viață în cursul AMA în condiții de flux continuu**

| Ziua studiului | Porția de hrană (mg de hrană/animal/zi) |
|----------------|---|
| 0 – 4          | 30                                      |
| 5 – 7          | 40                                      |
| 8 – 10         | 50                                      |
| 11 – 14        | 70                                      |
| 15 – 21        | 80                                      |

**Chimie analitică**

14. Înainte de efectuarea unui studiu, stabilitatea substanței chimice testate ar trebui evaluată utilizând informațiile existente referitoare la solubilitatea, degradabilitatea și volatilitatea sa. Soluțiile de testat din fiecare bazin replică la fiecare concentrație ar trebui eșantionate pentru analize de chimie analitică la începerea testării (ziua 0) și săptămânal pe durata testării, cu un minimum de patru eșantioane. De asemenea, se recomandă ca fiecare concentrație de testare să fie analizată pe durata pregătirii sistemului, înainte de începerea testării, în vederea verificării performanței sistemului. În plus, se recomandă ca soluțiile stoc să fie analizate atunci când sunt modificate, în special dacă volumul soluției stoc nu furnizează cantități corespunzătoare de substanțe chimice pentru a acoperi durata perioadelor de eșantionare de rutină. În cazul substanțelor chimice care nu pot fi detectate la anumite concentrații sau la toate concentrațiile utilizate într-o testare trebuie măsurate soluțiile stoc și trebuie înregistrate debitele sistemului pentru a calcula concentrațiile nominale.

**Livrarea substanței chimice**

15. Metoda utilizată pentru a introduce substanța chimică testată în sistem poate varia în funcție de proprietățile sale fizico-chimice. Substanțele chimice solubile în apă pot fi dizolvate în alicote de apă de testare la o concentrație care permite livrarea la concentrația de testare vizată în cadrul unui sistem cu flux continuu. Substanțele chimice care sunt lichide la temperatura camerei și greu solubile în apă pot fi introduse cu ajutorul metodelor care implică o saturare lichid:lichid. Substanțele chimice care sunt solide la temperatura camerei și greu solubile în apă pot fi introduse cu ajutorul unor coloane de saturare cu vată de sticlă (7). Se preferă utilizarea unui sistem de testare fără cărași, totuși, diferitele substanțe chimice testate vor avea proprietăți fizico-chimice diferite care probabil

## ▼ M6

vor necesita diferite abordări pentru pregătirea apei de expunere la substanțe chimice. Este de preferat să se depună eforturi pentru a evita solvenții sau cărașii deoarece: *i)* anumiți solvenți pot fi ei înșiși toxici și/sau pot induce răspunsuri endocrinologice nedorite sau neașteptate, *ii)* testarea substanțelor chimice în concentrații care depășesc solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent în cazul solvenților) pot conduce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective și *iii)* utilizarea solvenților în teste cu o durată mai lungă poate conduce la un grad semnificativ de formare de „biofilme” asociat cu activitatea microbiană. În ceea ce privește substanțele chimice care sunt dificil de testat, trebuie utilizat, în ultimă instanță, un solvent și trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (4) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice. Solvenții care s-au dovedit eficienți pentru testarea toxicității acvatică includ acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilenglicolul. În cazul în care este utilizat un solvent-căraș, concentrațiile solventului trebuie să fie sub concentrația fără efecte observabile (*No Observed Effect Concentration* – NOEC) cronică; documentul de orientare al OCDE recomandă un maximum de 100 μl/l; o examinare recentă recomandă utilizarea de concentrații ale solvenților de maximum 20 μl/l în apa de diluție (12). În cazul în care sunt utilizați solvenți-cărași, trebuie evaluate controalele cu solvent adecvate în plus față de controalele fără solvent (apă curată). În cazul în care nu este posibilă administrarea unei substanțe chimice cu ajutorul apei, fie din cauza caracteristicilor fizico-chimice (solubilitate mică) sau disponibilitate limitată a substanței chimice, poate fi luată în considerare introducerea acesteia prin alimentație. Au fost efectuate activități preliminare privind expunerile prin hrană; totuși, această rută de expunere nu este utilizată frecvent. Alegerea metodei trebuie documentată și verificată în mod analitic.

### Selectarea concentrațiilor de testare

#### Stabilirea concentrației de testare mari

16. În scopul acestei testări, concentrația de testare mare trebuie stabilită de limita de solubilitate a substanței chimice testate; concentrația maximă tolerată (*maximum tolerated concentration* – MTC) pentru substanțele chimice cu toxicitate acută; sau 100 mg/l, oricare este concentrația cea mai mică.
17. MTC este definită drept cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice care determină o mortalitate acută de sub 10 %. Utilizarea acestei metode presupune faptul că există date empirice privind mortalitatea acută pe baza cărora poate fi estimată MTC. Estimarea MTC poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită judecată profesională. Cu toate că utilizarea de modele de regresie poate fi cea mai bună abordare din punct de vedere tehnic pentru a estima MTC, o aproximare utilă a MTC poate fi obținută din datele existente privind toxicitatea acută utilizând 1/3 din valoarea LC<sub>50</sub> acute. Totuși, datele privind toxicitatea acută pot lipsi în cazul speciilor testate. În cazul în care nu sunt disponibile date specifice privind toxicitatea acută pentru specii, poate fi efectuat un test LC<sub>50</sub> de 96 de ore cu mormoloci reprezentativi (adică, în același stadiu) pentru cei testați în cadrul AMA. În mod opțional, în cazul în care sunt disponibile date privind alte specii acvatice (ex., studii LC<sub>50</sub> la pești și alte specii de amfibieni), judecata profesională poate fi utilizată pentru a estima o MTC probabilă pe baza extrapolării inter-specii.
18. În mod alternativ, în cazul în care substanța chimică nu este toxică în mod acut și este solubilă la peste 100 mg/l, atunci valoarea de 100 mg/l ar trebui considerată concentrația de testare cea mai mare (*highest test concentration* – HTC), deoarece această concentrație este considerată în mod tipic ca fiind „practic netoxică”.

▼ **M6**

19. Deși nu este procedura recomandată, metode statice cu reînnoire pot fi utilizate în cazurile în care metodele cu flux continuu nu sunt adecvate pentru a obține MTC. În cazul în care sunt utilizate metode statice cu reînnoire, stabilitatea concentrației substanței chimice testate trebuie documentată și trebuie să rămână în limitele criteriilor privind performanța. Sunt recomandate perioade de reînnoire de douăzeci și patru de ore. Perioadele de reînnoire care depășesc 72 de ore nu sunt acceptabile. În plus, parametrii privind calitatea apei (OD, temperatură, pH, etc.) trebuie măsurati la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, imediat înainte de reînnoire.

*Intervalul de concentrații de testare*

20. Este necesar un număr *minim* de trei concentrații de testare și un control cu apă curată (și un control cu vehicul, dacă este necesar). Diferența minimă a concentrației de testare între cea mai mare și cea mai mică trebuie să fie de aproximativ un ordin de mărime. Separarea maximă a dozei este de 0,1 și cea minimă este de 0,33.

**PROCEDURA****Începerea și realizarea testului***Ziua 0*

21. Expunerea trebuie începută în momentul în care un număr suficient de mormoloci din populația stocului de preexpunere a atins stadiul de dezvoltare de 51, conform Nieuwkoop și Faber (8), și care au vârsta mai mică sau egală cu 17 zile după fertilizare. Pentru selectarea animalelor de testare, mormoloci sănătoși și cu aspect normal din cadrul populației stoc trebuie comasați într-un singur vas care să conțină un volum corespunzător de apă de diluție. Pentru determinarea stadiului de dezvoltare, mormolocii trebuie să fie îndepărtați în mod individual din bazinul de în care au fost comasați, cu ajutorul unei mici plase sau strecurători și trebuie transferați într-un spațiu de măsurare transparent (de exemplu, placă Petri de 100 mm) care conține apă de diluție. Pentru determinarea stadiului, este preferabil să nu se recurgă la anestezie, însă mormolocii pot fi anesteziați individual utilizând 100 mg/l de metansulfonat de tricaină (de exemplu, MS-222), tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu (pH 7) înainte de manipulare. Dacă este utilizată, metodologia de utilizare corespunzătoare, de exemplu a MS-222, pentru anestezie trebuie obținută de la laboratoare experimentate și raportată împreună cu rezultatele testului. Animalele trebuie să fie manipulate cu grijă pe durata acestui transfer pentru a minimaliza stresul cauzat de manipulare și pentru a evita orice leziune.
22. Stadiul de dezvoltare al animalelor este determinat cu ajutorul un microscop de disecție binocular. Pentru a reduce variabilitatea ultimă în stadiul de dezvoltare, este important ca determinarea stadiului să fie realizată cât mai exact posibil. Conform Nieuwkoop și Faber (8), reperul principal care indică stadiul de dezvoltare utilizat pentru selectarea organismelor din stadiul 51 este morfologia membrelor posterioare. Caracteristicile morfologice ale membrelor posterioare trebuie să fie examinate la microscop. Dacă pentru informații complete privind determinarea stadiului mormolocilor trebuie să se consulte ghidul Nieuwkoop și Faber (8), stadiul poate fi determinat în mod fiabil utilizând reperele morfologice majore. Tabelul de mai jos poate fi utilizat pentru a simplifica și pentru a standardiza procesul de determinare a stadiului pe întreaga durată a studiului prin identificarea acelor repere morfologice majore care sunt asociate unor diferite stadii, presupunând că dezvoltarea este normală.

▼ **M6**

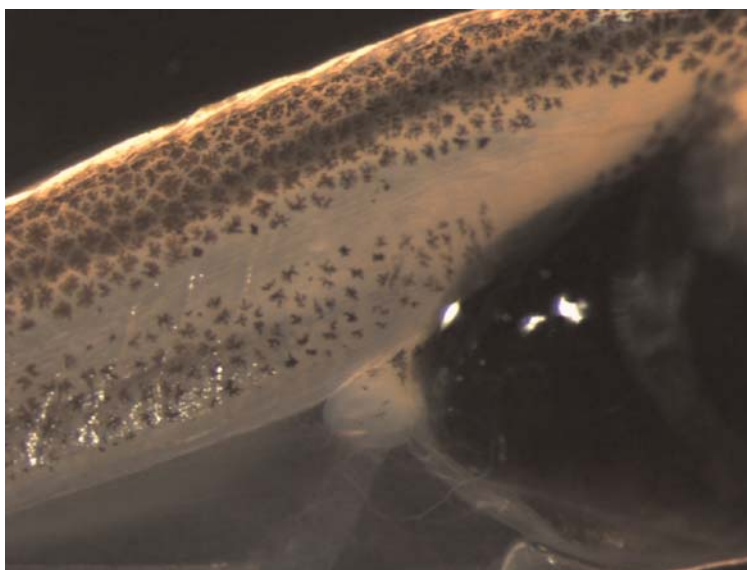
Tabelul 2

**Repere morfologice majore de stadializare conform ghidului Neuwkoop și Faber.**

| Repere morfologice majore    | Stadiu de dezvoltare |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                              | 51                   | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 |
| Membre posterioare           | X                    | X  | X  | X  | X  | X  | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Membre anterioare            |                      |    |    |    |    | X  | X  | X  | X  | X  |    |    |    |    |    |    |
| Structura craniofacială      |                      |    |    |    |    |    |    |    |    | X  | X  | X  | X  |    |    |    |
| Morfologia nervului olfactiv |                      |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  | X  | X  |    |    |    |
| Lungimea cozii               |                      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  | X  | X  | X  |

23. Pentru începerea testului, toți mormolocii trebuie să fie în stadiul 51. Cel mai important reper morfologic major de stadializare pentru stadiul respectiv este morfologia membrilor posterioare, care este demonstrată în Figura 1.

Figura 1

**Morfologia membrilor posterioare a unui mormoloc *X. laevis* în stadiul 51.**

24. În plus față de selectarea stadiului de dezvoltare, poate fi folosită selectarea opțională a dimensiunii animalelor utilizate în scopuri experimentale. În acest scop, lungimea corpului întreg (nu SVL) trebuie măsurată în ziua 0 pentru un subeșantion de aproximativ 20 de mormoloci aflați în stadiul 51 conform NF. După calcularea mediei lungimii corpului întreg pentru acest grup de animale, limitele minimă și maximă pentru lungimea corpului întreg a animalelor utilizate în scopuri experimentale pot fi stabilite permițând un interval al valorii medii de  $\pm 3$  mm (valorile medii ale lungimii corpului întreg sunt cuprinse între 24 și 28,1 mm pentru mormolocii în stadiul 51). Cu toate acestea, determinarea stadiului de dezvoltare constituie parametrul principal în a determina dacă fiecare animal este gata de testare. Mormolocii care prezintă malformații sau leziuni vizibile macroscopic trebuie excluși de la testare.

▼ **M6**

25. Mormolocii care îndeplinesc criteriile de stadializare descrise mai sus sunt ținuți într-un bazin cu apă curată de cultură până la finalizarea procesului de determinare a stadiului. După finalizarea procesului de determinare a stadiului, larvele sunt distribuite în mod aleatoriu în bazinele de tratament de expunere până când fiecare bazin conține 20 de larve. Fiecare bazin de tratament este ulterior inspectat pentru a detecta animale cu aspect anormal (de exemplu, leziuni, comportament de înot anormal, etc.). Mormolocii cu un aspect evident nesănătos trebuie îndepărtați din bazinele de tratament și înlocuiți cu larve nou selectate din bazinul de comasare.

**Observații**

26. Pentru informații mai aprofundate privind procedurile de terminare a testării și prelucrarea mormolocilor, a se consulta „*OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*” (Document de orientare al OCDE privind histologia tiroidei amfibienilor) (9).

*Ziua 7 Măsurători*

27. În ziua 7, cinci mormoloci aleși în mod aleatoriu per replică sunt îndepărtați din fiecare bazin de testare. Procedura de selectare aleatorie utilizată trebuie să confere fiecărui organism testat o probabilitate egală de a fi selectat. Aceasta se poate realiza prin utilizarea oricărei metode de randomizare, însă necesită ca fiecare mormoloc să fie prins. Mormolocii neselectați sunt transferați înapoi în bazinul de origine, iar mormolocii selectați sunt eutanasiați fără cruzime excesivă în 150 – 200 mg/l MS-222 tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu pentru a se obține pH 7. Mormolocii eutanasiați sunt clătiți cu apă și uscați prin tamponare, proces urmat de determinarea greutății corporale cu rotunjire la cel mai apropiat miligram. Lungimea membrelor posterioare, lungimea bot-cloacă și stadiul de dezvoltare sunt determinate pentru fiecare mormoloc (cu ajutorul unui microscop de disecție binoculară).

*Ziua 21 Măsurători (încheierea testului)*

28. În momentul încheierii testului (ziua 21), mormolocii rămași sunt îndepărtați din bazinele de testare și eutanasiați fără cruzime excesivă în 150 – 200 mg/l MS-222 tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu, astfel cum se descrie mai sus. Mormolocii sunt clătiți cu apă și uscați prin tamponare, proces urmat de determinarea greutății corporale cu rotunjire la cel mai apropiat miligram. Stadiul de dezvoltare, SVL și lungimile membrelor posterioare sunt măsurate pentru fiecare mormoloc.
29. Toate larvele sunt plasate în soluție de fixare Davidson timp de 48 – 72 de ore, fie ca eșantioane de corp întreg, fie ca eșantioane fără cap conținând maxilarul inferior pentru evaluări histologice. Pentru histopatologie, trebuie prelevați din fiecare bazin replică un număr total de cinci mormoloci. Având în vedere faptul că înălțimea unei celule foliculare depinde de stadiu (10), cea mai adecvată metodă în ceea ce privește eșantionarea pentru analize histologice este, ori de câte ori este posibil, utilizarea unor indivizi aflați în stadii de dezvoltare compatibile. În vederea selectării indivizilor aflați în stadii de dezvoltare compatibile, trebuie determinat stadiul de dezvoltare a tuturor larvelor înainte de selectare și prelucrarea ulterioară în vederea colectării și conservării de date. Acest lucru este necesar deoarece divergența normală în dezvoltare va avea ca rezultat distribuții stadiale distincte în cadrul fiecărui bazin replică.
30. Animalele selectate pentru histopatologie (n = 5 din fiecare bazin replică) trebuie corelate mediane stadiului controalelor (replici comasate), ori de câte ori este posibil. În cazul în care există bazine replică în care se află mai mult de cinci larve în stadiul corespunzător, atunci cinci larve sunt selectate în mod aleatoriu.



▼ **M6**

31. În cazul în care există bazine replică cu mai puțin de cinci larve în stadiul corespunzător, atunci indivizii selectați în mod aleatoriu din stadiul vecin de dezvoltare, inferior sau superior, trebuie să fie eșantionați pentru a constitui o dimensiune totală a eșantionului de cinci larve per replică. De preferință, decizia de a eșantiona larve suplimentare din stadiul vecin de dezvoltare, inferior sau superior, trebuie luată pe baza unei evaluări generale a distribuției stadiilor în bazinele de control și în cele cu tratament chimic. Adică, în cazul în care tratamentul chimic este asociat cu o întârziere a dezvoltării, trebuie eșantionate larve suplimentare din stadiul imediat inferior. În schimb, în cazul în care tratamentul chimic este asociat cu o accelerare a dezvoltării, trebuie eșantionate larve suplimentare din stadiul imediat superior.
32. În caz de modificări severe ale dezvoltării mormolocilor ca urmare a tratamentului cu o substanță chimică testată, ar putea să nu existe o suprapunere a distribuției stadiilor în bazinele cu tratament chimic cu stadiul de dezvoltare median calculat în bazinele de control. Doar în aceste cazuri, procesul de selecție trebuie să fie modificat utilizând un stadiu diferit de stadiul median de control pentru a se obține o eșantionare compatibilă cu stadiul a larvelor pentru histopatologie tiroidiană. În plus, dacă stadiile sunt nedeterminate (asincronie), 5 mormoloci din fiecare replică trebuie aleși în mod aleatoriu pentru analiza histologică. Raționamentul care stă la baza eșantionării oricărei larve care nu se află într-un stadiu echivalent cu stadiul de dezvoltare median de control trebuie raportată.

**Determinarea parametrilor biologici studiați**

33. Pe durata fazei de expunere de 21 de zile, măsurarea principalilor parametri studiați este realizată în zilele 7 și 21, fiind necesară, totuși, observarea zilnică a animalelor testate. Tabelul 3 conține o prezentare generală a parametrilor studiați care vor fi măsurați și a momentelor de observare corespunzătoare. Informații mai detaliate privind procedurile tehnice de măsurare a parametrilor studiați apicali și evaluările histologice sunt disponibile în documentele de orientare ale OCDE (9).

*Tabelul 3***Momentele de observare a principalilor parametri studiați în AMA.**

| Parametrii apicali               | Zilnic | Ziua 7 | Ziua 21 |
|----------------------------------|--------|--------|---------|
| — Mortalitate                    | •      |        |         |
| — Stadiu de dezvoltare           |        | •      | •       |
| — Lungimea membrelor posterioare |        | •      | •       |
| — Lungimea bot-cloacă            |        | •      | •       |
| — Greutatea corporală umedă      |        | •      | •       |
| — Histologia glandei tiroide     |        |        | •       |



▼ **M6****Parametrii apicali**

34. Stadiul de dezvoltare, lungimea membrelor posterioare, SVL și greutatea umedă sunt parametrii apicali ai AMA, fiecare fiind descris în mod succint mai jos. În documentele de orientare din referințe sunt disponibile mai multe informații tehnice referitoare la colectarea acestor date, inclusiv proceduri de analiză asistate de calculator, care sunt recomandate pentru a fi utilizate.

*Stadiu de dezvoltare*

35. Stadiul de dezvoltare al mormolocilor de *X. laevis* este determinat cu ajutorul criteriilor de determinare a stadiului de dezvoltare conform Nieuwkoop și Faber (8). Datele privind stadiul de dezvoltare sunt utilizate pentru a determina dacă dezvoltarea este accelerată, asincronă, întârziată sau neafectată. Accelerarea sau întârzierea dezvoltării este determinată prin compararea mediane stadiilor atinse de grupele de control și de grupele tratate. Dezvoltarea asincronă este raportată atunci când țesuturile examinate nu prezintă nicio anomalie sau malformație, însă ritmul morfogenezei sau al dezvoltării diferitelor țesuturi este perturbat la un singur mormoloc.

*Lungimea membrelor posterioare*

36. Diferențierea și creșterea membrelor posterioare se află sub controlul hormonilor tiroidieni și reprezintă repere majore de dezvoltare deja utilizate în determinarea stadiului de dezvoltare. Dezvoltarea membrelor posterioare este utilizată calitativ în determinarea stadiului de dezvoltare, însă aici este luată în considerare ca parametru cantitativ. Prin urmare, lungimea membrelor posterioare este măsurată ca parametru studiat în vederea detectării efectelor asupra axului tiroidian (figura 2). Din motive de coerență, lungimea membrelor posterioare este măsurată la nivelul membrului posterior stâng. Lungimea membrelor posterioare este evaluată în ziua 7 și în ziua 21 a testului. În ziua 7, măsurarea lungimii membrelor posterior este simplă, astfel cum se ilustrează în figura 2. Cu toate acestea, măsurarea lungimii membrelor posterioare în ziua 21 este mai complicată ca urmare a flectării membrelor. Prin urmare, măsurarea lungimii membrelor posterioare în ziua 21 trebuie să înceapă de la peretele cavității abdominale și să urmeze linia mediană a membrului prin orice devieri unghiulare. Modificările lungimii membrelor posterioare în ziua 7, chiar dacă nu sunt evidente în ziua 21, sunt considerate în continuare semnificative pentru potențialul activității tiroidiene. Măsurătorile lungimilor sunt obținute fotografii digitale utilizând programe informatice de analiză, astfel cum este descris în documentul OCDE de orientare privind histologia tiroidei amfibienilor (9).

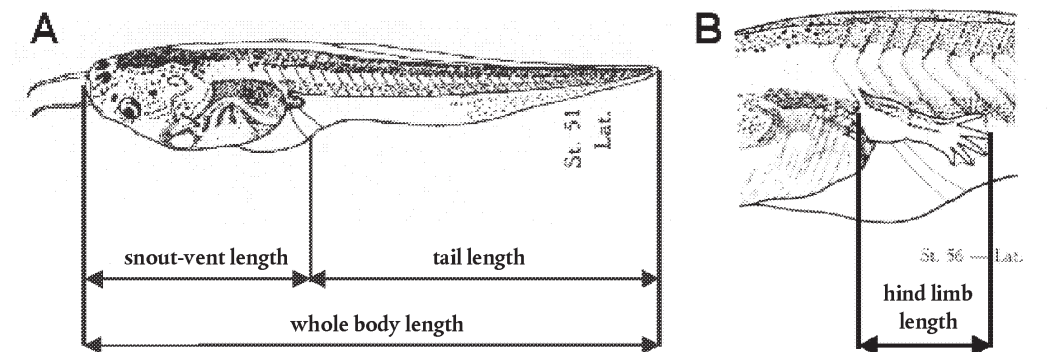
*Lungimea corpului și greutatea umedă*

37. Determinarea lungimii bot-cloacă (SVL) (figura 2) și a greutății umede este inclusă în protocolul de testare în vederea evaluării efectelor posibile ale substanțelor chimice testate asupra ritmului de creștere a mormolocilor în raport cu grupul de control și sunt utile în detectarea toxicității generale determinate de substanța chimică testată. Întrucât eliminarea apei aderente pentru determinarea greutății poate provoca condiții de stres pentru mormoloci și poate cauza leziuni ale pielii, aceste măsurători sunt efectuate în ziua 7 pe mormolocii subeșantionați și pe toți mormolocii rămași la încheierea testului (ziua 21). Din motive de coerență, ca limită caudală de măsurare trebuie utilizat partea cranială a cloacei.
38. Lungimea bot-cloacă (SVL) este utilizată pentru a evalua creșterea mormolocilor astfel cum se ilustrează în figura 2.

## ▼ M6

Figura 2

(A) Tipuri de măsurători ale lungimii corpului și (B) măsurători ale lungimii membrelor posterioare pentru mormoloci de *X. laevis* (1).



### Histologia glandei tiroide

39. În timp ce stadiul de dezvoltare și lungimea membrelor posterioare reprezintă parametrii studiați importanți pentru evaluarea schimbărilor legate de expunere în dezvoltarea metamorfică, întârzierea în dezvoltare nu poate considerată, prin ea însăși, un indicator cu valoare diagnostică pentru activitatea antitiroidiană. Unele modificări pot fi observate doar prin analiza histopatologică de rutină. Criteriile de diagnostic includ hipertrofia/atrofia glandei tiroide, hipertrofia celulelor foliculare, hiperplazia celulelor foliculare și următoarele criterii calitative suplimentare: zona luminală foliculară, calitate coloidului și înălțimea/forma celulelor foliculare. Gradele de gravitate (4 grade) trebuie raportate. Informații privind obținerea și prelucrarea eșantioanelor pentru analize histologice și pentru efectuarea analizelor histologice pe eșantioane de țesuturi sunt disponibile în „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation*” (Testul metamorfozei la amfibieni: Partea 1 – Orientare tehnică pentru eșantionare morfologică și pregătire histologică) și în „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*” (Testul metamorfozei la amfibieni: Partea 2 – Metodă de interpretare a studiilor, criterii de diagnostic, aprecierea severității și atlas) (9). Laboratoarele care efectuează testul pentru prima dată (primele dăți) trebuie să solicite consiliere din partea unor patologi cu experiență în scopuri de formare înainte de efectuarea analizei histologice și a evaluării glandei tiroide. Schimbările evidente și semnificative în ceea ce privește parametrii apicali indicând accelerarea sau asincronia dezvoltării pot exclude necesitatea efectuării analizei histopatologice a glandelor tiroide. Cu toate acestea, absența unor modificări morfologice evidente sau a dovezilor privind întârzierea dezvoltării impun efectuarea analizelor histologice.

### Mortalitate

40. Toate bazinele de testare trebuie verificate zilnic pentru a verifica dacă nu există mormoloci morți, iar numărul acestora se înregistrează pentru fiecare bazin. Data, concentrația și numărul bazinelor trebuie înregistrate pentru orice activitate de observare a mortalității. Animalele moarte trebuie îndepărtate din bazinul de testare imediat după ce au fost observate. O rată a mortalității de peste 10 % poate indica condiții de testare necorespunzătoare sau efecte toxice ale substanței chimice testate.

### Observații suplimentare

41. Cazurile de comportament anormal și de malformații și leziuni vizibile macroscopic trebuie înregistrate. Data, concentrația și numărul bazinului trebuie înregistrate în caz că se observă comportament anormal, malformații sau leziuni vizibile macroscopic. Comportamentul normal

▼ **M6**

este caracterizat prin rămânerea mormolocilor suspendați în coloana de apă cu coada ridicată deasupra capului, bătaia ritmică și regulată a înotătoarei caudale, ridicarea periodică la suprafață, opercularea și receptivitatea la stimuli. Un comportament anormal ar include, de exemplu, plutirea la suprafață, rămânerea pe fundul bazinului, înotare inversată sau neregulată, lipsa de activitate la suprafață și lipsa de reacție la stimuli. În plus, diferențele mari în consumul de hrană între tratamente trebuie înregistrate. Malformațiile și leziuni majore ar putea include anomalii morfologice (de exemplu, deformări ale membrilor), leziuni hemoragice, infecții bacteriene sau fungice, pentru a menționa doar câteva. Aceste determinări sunt calitative și trebuie considerate analoage semnelor clinice de boală/stres și trebuie raportate la animalele de control. În cazul în care apariția sau rata apariției este mai mare în bazinele expuse decât în cele de control, atunci acestea ar trebui considerate drept dovadă de toxicitate evidentă.

**DATE ȘI RAPORTARE****Colectarea de date**

42. Toate datele trebuie colectate cu ajutorul sistemelor electronice sau manuale care sunt în conformitate cu bunele practici de laborator (BPL). Datele studiului trebuie să includă:

*Substanța chimică testată:*

- Caracterizarea substanței chimice testate: proprietățile fizico-chimice; informații referitoare la stabilitate și biodegradabilitate;
- Informații și date privind substanța chimică: metoda și frecvența de pregătire a diluțiilor. Informațiile referitoare la substanța chimică testată includ concentrațiile reale și nominale ale substanței chimice testate, iar în unele cazuri, substanțe chimice neparentale, după caz. Măsurătorile privind substanța chimică testată pot fi necesare pentru soluțiile stoc, precum și pentru soluțiile de testare;
- Solvent (dacă este altul decât apa): justificarea alegerii unui solvent și caracterizarea solventului (natură, concentrație utilizată);

*Condiții de testare:*

- Înregistrări operaționale: acestea constau în observații referitoare la funcționarea sistemului de testare și la mediul și infrastructura de sprijin. Înregistrările tipice includ: temperatura ambiantă, temperatura de testare, perioada de expunere la lumină, starea componentelor critice ale sistemului de expunere (de exemplu pompe, contoare de cicluri, presiuni), debite, niveluri de apă, schimbări ale recipientelor de rezervă, precum și înregistrări privind hrănirea. Parametrii generali de calitate a apei includ: pH, OD, conductivitate, iod total, alcalinitate și duritate;
- Abateri de la metoda de testare: aceste informații trebuie să includă orice informație sau descrieri ale abaterilor de la metoda de testare;

*Rezultate:*

- Observații și date biologice: acestea includ observații zilnice legate de mortalitate, consumul de alimente, comportamentul de înot anormal, letargie, pierderea echilibrului, malformații, leziuni, etc. Observațiile și datele colectate la intervale prestabilite includ: stadiul de dezvoltare, lungimea membrilor posterioare, lungimea bot-cloacă și greutatea umedă;

▼ **M6**

- Tehnicile de analiză statistică și justificarea tehnicilor utilizate; rezultatele analizei statistice, de preferat, sub formă de tabel;
- Date histologice: acestea includ descrieri, precum și severitatea gradată și scoruri privind incidența unor observații specifice, astfel cum se detaliază în documentul de orientare privind histopatologia;
- Observații *ad hoc*: aceste observații trebuie să includă descrieri ale studiului care nu se încadrează în categoriile descrise anterior.

**Raportarea datelor**

43. Apendicele 2 conține foi de calcul privind colectarea zilnică a datelor care pot fi utilizate ca orientări pentru introducerea datelor brute și pentru calcularea statisticilor sumare. În plus, tabelele de raportare sunt astfel elaborate încât să fie convenabile pentru comunicarea rezumatelor datelor privind parametrii studii. Tabelele de raportare pentru evaluările histologice pot fi consultate în apendicele 2.

**Criterii de performanță și de acceptabilitate/validitate a testelor**

44. În general, abaterile majore de la metoda de testare vor conduce la date inacceptabile pentru interpretare sau raportare. Prin urmare, următoarele criterii din tabelul 4 au fost dezvoltate ca orientare pentru determinarea calității testului efectuat, performanța generală a organismelor de control.

Tabelul 4

**Criterii de performanță pentru testul AMA.**

| Criteriu  | Limite acceptabile  |
|---|---|
| Concentrațiile testate  | Menținute la $\leq 20\%$ CV (coeficient de variație) (variabilitatea concentrațiilor de testare măsurate) pe parcursul testului cu durata de 21 de zile |
| Mortalitatea în grupurilor de control;  | $\leq 10\%$ – mortalitatea în orice replică în grupurile de control trebuie să nu depășească 2 mormoloci  |
| Stadiul de dezvoltare median minim al grupurilor de control la sfârșitul testului | 57  |
| Intervalul stadiilor de dezvoltare în grupul de control                           | A 10-a și a 90-a procentilă a distribuției stadiilor de dezvoltare nu trebuie să difere cu mai mult de 4 stadii.  |
| Oxygen dizolvat   | $\geq 40\%$ față de saturația în aer (*)  |
| pH  | pH-ul trebuie menținut între 6,5 și 8,5. Diferențele între replici/tratament nu trebuie să depășească 0,5.  |
| Temperatura apei  | $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ – diferențele între replici/tratament nu trebuie să depășească $0,5^{\circ}\text{C}$ .                               |
| Concentrațiile de testare fără toxicitate evidentă                                | $\geq 2$  |
| Performanța replicii  | $\leq 2$ replici per test pot fi compromise   |

▼ **M6**

| Criteriu  | Limite acceptabile   |
|---|--|
| Condiții speciale de utilizare a unui solvent         | Dacă se utilizează un solvent căraș, trebuie să se utilizeze un vas de control cu solvent și un vas de control cu apă curată, iar rezultatele trebuie raportate.   |
|   | Diferențele semnificative din punct de vedere statistic dintre vasul de control cu solvent și vasul de control cu apă curată sunt tratate în mod specific. Pentru informații suplimentare, a se vedea mai jos. |
| Condiții speciale pentru sistemul static cu reînnoire | Analizele substanțelor chimice reprezentative înainte și după reînnoire trebuie raportate.   |
|   | Nivelurile de amoniac trebuie măsurate imediat înainte de reînnoire.   |
|   | Toți parametrii legați de calitatea apei enumerați în tabelul 1 din apendicele 1 trebuie măsurați imediat înainte de reînnoire.  |
|   | Perioada de reînnoire nu trebuie să depășească 72 de ore.  |
|   | Program corespunzător de hrănire (50 % din porția zilnică de hrană din hrana comercială pentru mormoloci)  |

(\*) Aerarea apei poate fi menținută prin barbotoare. Se recomandă setarea barbotoarelor la niveluri care să nu creeze mormolocilor un stres inutil.

**Validitatea testului**

45. Pentru ca un test să fie considerat acceptabil/valid, trebuie să fie îndeplinite următoarele cerințe:

Experiment valid în cadrul unui test determinat a fi negativ pentru activitatea tiroidei:

- (1) Pentru orice tratament dat (inclusiv în grupurile de control), mortalitatea nu poate depăși 10 %. Pentru orice replică dată, mortalitatea nu poate depăși trei mormoloci, în caz contrar replica este considerată compromisă
- (2) Cel puțin două niveluri de tratament, cu toate cele patru replici necompromise, trebuie să fie disponibile pentru analiză
- (3) Cel puțin două niveluri de tratament fără toxicitate evidentă ar trebui să fie disponibile pentru analiză

Experiment valid în cadrul unui test determinat a fi pozitiv pentru activitatea tiroidei:

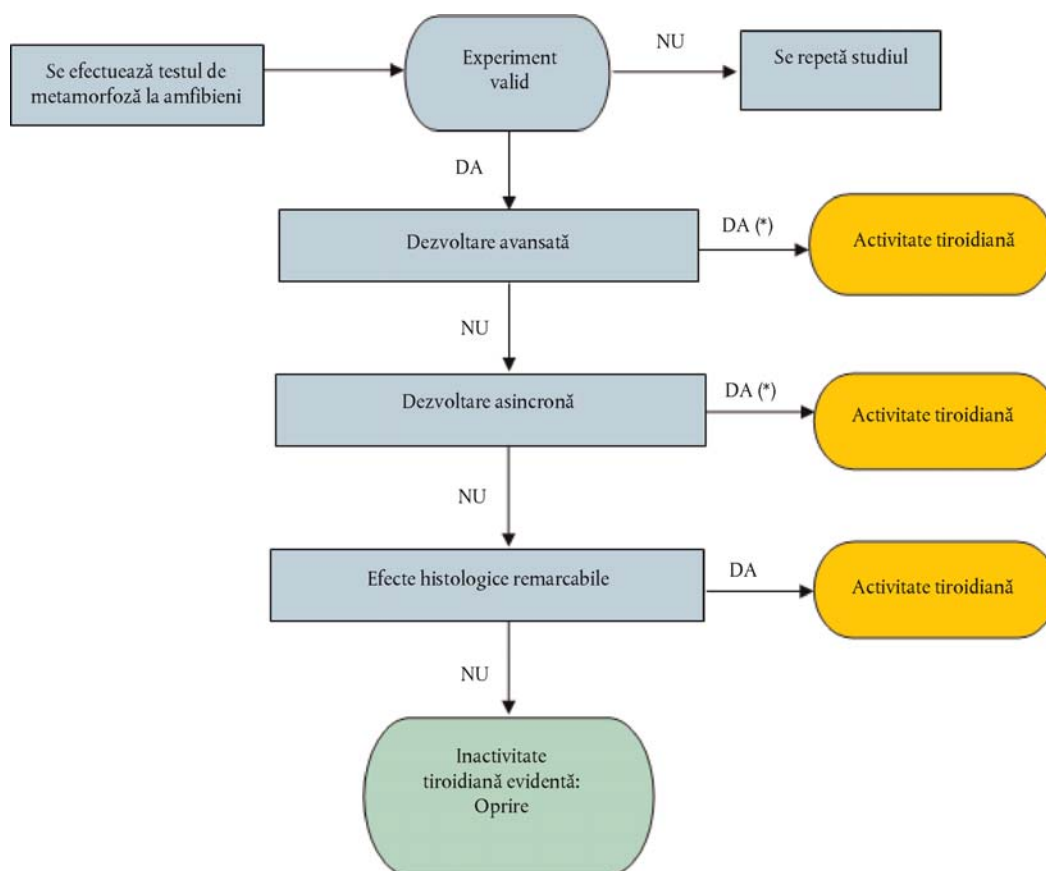
- (1) Poate exista mortalitate de maximum doi mormoloci/replică în grupul de control

**Arbore decizional pentru efectuarea testului AMA**

46. Arborele decizional a fost dezvoltat astfel încât testul AMA să ofere asistență logică în efectuarea și interpretarea rezultatelor biotestului (a se vedea diagrama din figura 3). Arborele decizional, în esență, ponderează parametrii prin faptul că dezvoltarea avansată, dezvoltarea asincronă și histopatologia tiroidiană au o importanță mare, în timp ce dezvoltarea întârziată, lungimea bot-cloacă și greutatea corporală umedă, parametri care pot fi potențial afectați de toxicitatea generală, au o importanță mai mică.

▼ **M6**

Figura 3

**Arbore decizional pentru efectuarea testului AMA.**

(\*) Histologia poate fi solicitată de unele autorități de reglementare în pofida diferențelor semnificative în ceea ce privește dezvoltarea avansată și asincronă. Entitatea care efectuează acest test este încurajată să consulte autoritățile necesare înainte de efectuarea testului pentru a determina parametrii studiați necesari

*Dezvoltarea avansată (determinată utilizând stadiul de dezvoltare, SVL și HLL)*

47. Dezvoltarea avansată este cunoscută ca survenind numai prin efecte datorate hormonilor tiroidieni. Acestea pot fi efecte la nivelul țesuturilor periferice, precum interacțiunea directă cu receptorul hormonilor tiroidieni (cum ar fi T4) sau efecte care modifică nivelurile circulante ale hormonilor tiroidieni. În oricare dintre cazuri, acestea sunt considerate dovezi suficiente pentru a indica faptul că substanța chimică are activitate tiroidiană. Dezvoltarea avansată este evaluată în unul din două moduri. În primul mod, stadiul de dezvoltare generală poate fi evaluat pe baza metodei standardizate detaliate în Nieuwkoop și Faber (8). În al doilea mod, caracteristici morfologice specifice pot fi cuantificate, precum lungimea membrilor posterioare, în zilele 7 și 21, ele fiind asociate în mod pozitiv cu efecte agoniste asupra receptorilor hormonilor tiroidieni. În cazul în care apar progrese semnificative statistic în ceea ce privește dezvoltarea sau lungimea membrilor posterioare, testul indică faptul că substanța chimică are activitate tiroidiană.

▼ **M6**

48. Evaluarea animalelor testate privind prezența unei dezvoltări accelerate în raport cu populația de control se va baza pe rezultatele analizelor statistice efectuate pentru următorii patru parametri:

— lungimea membrelor posterioare (normalizată prin lungimea bot-cloacă) în ziua de studiu 7

— lungimea membrelor posterioare (normalizată prin lungimea bot-cloacă) în ziua de studiu 21

— stadiul de dezvoltare în ziua de studiu 7

— stadiul de dezvoltare în ziua de studiu 21.

49. Analizele statistice ale lungimii membrelor posterioare trebuie efectuate pe baza măsurătorilor lungimii membrului posterior stâng. Lungimea membrelor posterioare este normalizată prin stabilirea raportului dintre lungimea membrelor posterioare și lungimea bot-cloacă pentru un individ. Media valorilor normalizate pentru fiecare nivel de tratament sunt ulterior comparate. Accelerarea dezvoltării este apoi indicată printr-o creștere semnificativă a mediei lungimii membrelor posterioare (normalizate) într-un grup de tratament chimic în raport cu grupul de control în ziua de studiu 7 și/sau în ziua de studiu 21 (a se vedea appendicele 3).

50. Analizele statistice ale stadiului de dezvoltare trebuie efectuate pe baza determinării stadiilor de dezvoltare în conformitate cu criteriile morfologice descrise de Nieuwkoop și Faber (8). Accelerarea dezvoltării este indicată atunci când analiza multicuantică detectează o creștere semnificativă a valorilor stadiilor de dezvoltare într-un grup de tratament chimic în raport cu grupul de control în ziua de studiu 7 și/sau în ziua de studiu 21.

51. În ceea ce privește metoda de testare AMA, un efect semnificativ asupra oricăruia din cei patru parametri sus-menționați este considerat suficient pentru o detectare pozitivă a dezvoltării accelerate. Aceasta înseamnă că efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare într-un moment specific nu necesită coroborare nici cu efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare la momentul alternativ și nici cu efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare în acest moment specific. În schimb, efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare la un moment specific nu necesită coroborare nici cu efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare în momentul alternativ și nici cu efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare în acest moment specific. Cu toate acestea, greutatea dovezilor privind dezvoltarea accelerată va crește dacă sunt detectate efecte semnificative la mai mult de un parametru.

*Dezvoltarea asincronă (determinată utilizând criteriile de determinare a stadiului de dezvoltare)*

52. Dezvoltarea asincronă este caracterizată prin perturbarea evoluției temporale a morfogenezei sau a dezvoltării diferitelor țesuturi într-un singur mormoloc. Incapacitatea de a stabili cu claritate stadiul de dezvoltare a unui organism utilizând setul de parametri morfologici considerați tipici pentru orice stadiu dat indică faptul că țesuturile se dezvoltă asincron prin metamorfoză. Dezvoltarea asincronă este un indicator al activității tiroidiene. Singurele modalități de acțiune cunoscute care conduc la dezvoltare asincronă sunt prin efecte ale substanțelor chimice asupra acțiunilor hormonilor tiroidieni la nivel periferic și/sau asupra metabolismului hormonilor tiroidieni în țesuturile în curs de dezvoltare astfel cum se observă în cazul inhibitorilor deiodinazei.

## ▼ M6

53. Evaluarea animalelor testate privind prezența dezvoltării asincrone în raport cu populația de control se va baza pe evaluarea morfologică macroscopică a animalelor testate în ziua de studiu 7 și în ziua de studiu 21.
54. Descrierea dezvoltării normale a *Xenopus laevis* de către Nieuwkoop și Faber (8) furnizează cadrul necesar identificării unei ordini secvențiale de remodelare a țesuturilor normale. Termenul „dezvoltare asincronă” se referă în mod specific la abaterile de la dezvoltarea morfologică macroscopică a mormolocilor care nu permit stabilirea definitivă a unui stadiu de dezvoltare în conformitate cu criteriile stabilite de Nieuwkoop și Faber (8), deoarece reperele morfologice esențiale prezintă caracteristici ale unor stadii diferite.
55. Astfel cum implică termenul „dezvoltare asincronă”, trebuie luate în considerare numai cazurile care prezintă abateri de la progresul remodelării țesuturilor specifice în raport cu progresul remodelării altor țesuturi. Unele fenotipuri clasice includ întârzierea sau absența apariției membrelor anterioare în pofida dezvoltării normale sau avansate a membrelor posterioare și a țesuturilor cozii, sau resorbția precoce a branhiilor în raport cu stadiul morfogenezei membrelor posterioare și resorbția cozii. Un animal va fi înregistrat ca prezentând o dezvoltare asincronă dacă acesta nu poate fi atribuit unui stadiu deoarece nu îndeplinește majoritatea criteriilor-reper de dezvoltare pentru un anumit stadiu conform Nieuwkoop și Faber (8) sau dacă există întârziere sau accelerare extremă a uneia sau a mai multor caracteristici esențiale (de exemplu, coadă complet resorbită, dar fără apariția membrelor anterioare). Această evaluare se efectuează calitativ și trebuie să examineze setul complet de caracteristici-reper enumerate de Nieuwkoop și Faber (8). Cu toate acestea, nu este necesară înregistrarea stadiului de dezvoltare a diferitelor caracteristici-reper ale animalelor observate. Animalelor înregistrate ca prezentând o dezvoltare asincronă nu li se atribuie un stadiu de dezvoltare Nieuwkoop și Faber (8).
56. Prin urmare, un criteriu central pentru desemnarea cazurilor de dezvoltare morfologică anormală ca „dezvoltare asincronă” este acela că momentul relativ al remodelării tisulare și al morfogenezei țesuturilor este perturbat în timp ce morfologia țesuturilor afectate nu este evident anormală. Un exemplu pentru ilustrarea acestei interpretări a anomaliilor morfologice macroscopice este faptul că o întârziere a morfogenezei membrelor posterioare în raport cu dezvoltarea altor țesuturi va îndeplini criteriul de „dezvoltare asincronă” în timp ce cazurile care prezintă lipsa membrelor posterioare, degete anormale (de exemplu ectrodactilie, polidactilie), sau alte malformații evidente ale membrelor nu trebuie considerate drept „dezvoltare asincronă”.
57. În acest context, principalele repere morfologice care trebuie evaluate din punctual de vedere al progresului lor metamorfic coordonat trebuie să includă morfogeneza membrelor posterioare, morfogeneza membrelor anterioare, apariția membrelor anterioare, stadiul de resorbție a cozii (în special resorbția înotătoare caudale) și morfologia capului (de exemplu, dimensiunea branhiilor și stadiul resorbției branhiilor, morfologia maxilarului inferior, proeminența cartilajului Meckel).
58. În funcție de modul de acțiune al substanței chimice, pot apărea diferite fenotipuri morfologice macroscopice. Unele fenotipuri clasice includ întârzieri sau absențe ale apariției membrelor anterioare în pofida dezvoltării normale sau avansate a membrelor posterioare și a țesuturi cozii, resorbția precoce a branhiilor în raport cu membrele posterioare și remodelarea cozii.



## ▼ M6

*Histopatologie*

59. În cazul în care substanța chimică nu cauzează toxicitate evidentă și nu accelerează dezvoltarea sau nu conduce la dezvoltare asincronă, atunci histopatologia glandelor tiroide este evaluată pe baza documentului de orientare adecvat (9). Întârzierea dezvoltării, în absența toxicității, reprezintă un indicator puternic al activității antitiroidiene, însă analiza stadiului de dezvoltare este mai puțin sensibilă și cu valoare diagnostică mai mică decât analiza histopatologică a glandei tiroide. Prin urmare, efectuarea de analize histopatologice ale glandelor tiroide este necesară în acest caz. Efectele asupra histologiei glandei tiroide au fost demonstrate în absența unor efecte asupra dezvoltării. În cazul în care apar modificări în histopatologia tiroidiană, substanța chimică este considerată a avea activitate tiroidiană. În cazul în care nu sunt observate întârzieri în dezvoltare sau leziuni histologice în glandele tiroide, substanța chimică este considerată a nu avea activitate tiroidiană. Raționamentul acestei decizii este faptul că glanda tiroidă este sub influența TSH și orice substanță chimică care modifică hormonii tiroidieni circulanți suficient pentru a modifica secreția de TSH va conduce la modificări histopatologice ale glandelor tiroide. Diverse moduri și mecanisme de acțiune pot modifica hormonii tiroidieni circulanți. Așadar, în timp ce nivelul hormonilor tiroidieni indică un efect tiroidian, el este insuficient pentru a determina modul sau mecanismul de acțiune care determină răspunsul.
60. Deoarece acest parametru nu poate fi analizat prin metode statistice de bază, determinarea unui efect asociat cu expunerea la o substanță chimică trebuie efectuată pe baza opiniei experte a unui patolog.

*Dezvoltarea întârziată (determinată utilizând stadiul de dezvoltare, HLL, BW, SVL)*

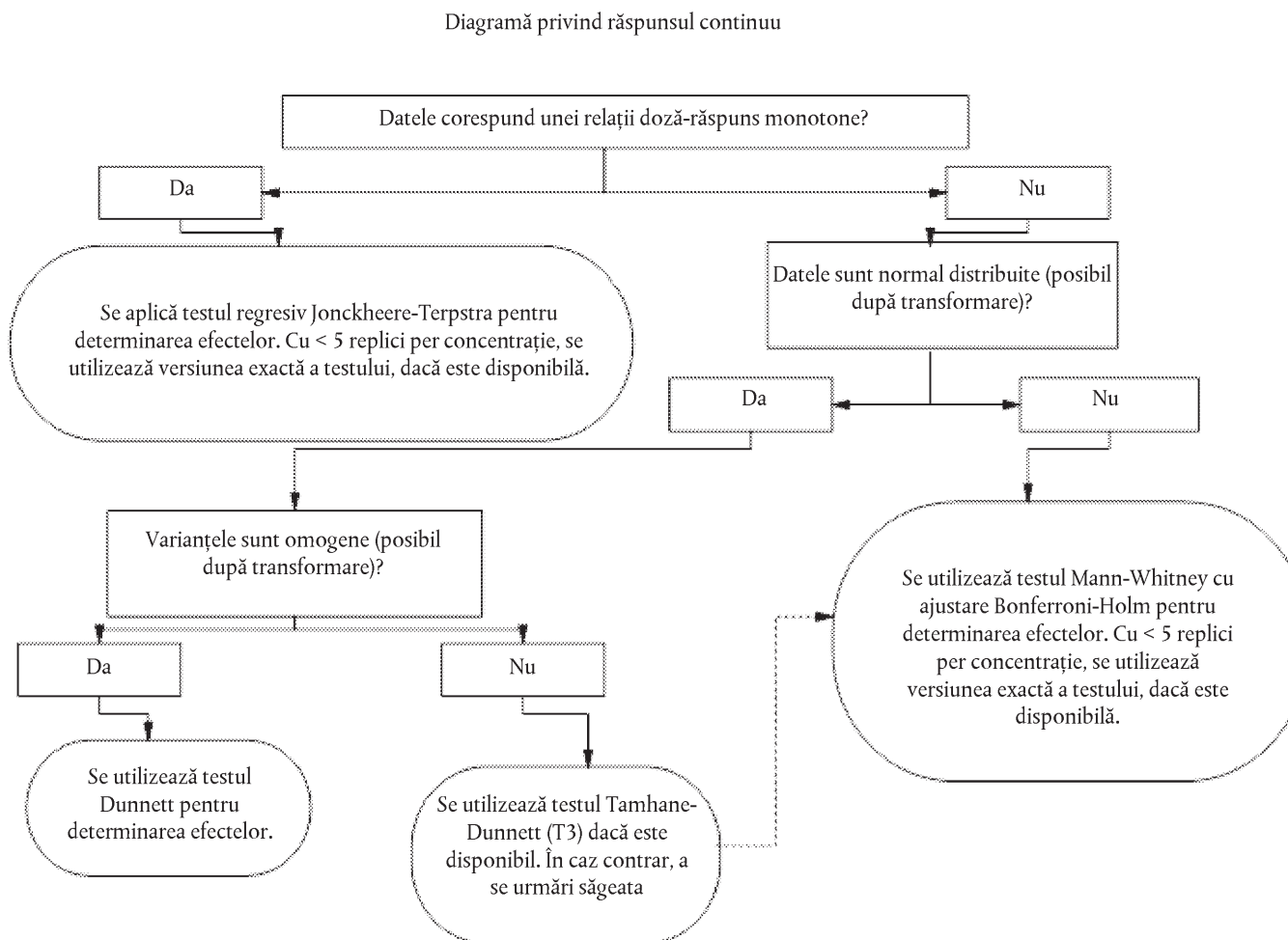
61. Dezvoltarea întârziată poate avea loc prin intermediul unor mecanisme antitiroidiene și prin toxicitate indirectă. Ușoarele întârzieri de dezvoltare cuplate cu semne evidente de toxicitate indică un posibil efect toxic nespecific. Evaluarea toxicității netiroidiene reprezintă un element esențial al testului pentru a reduce probabilitatea unor rezultate fals pozitive. Mortalitatea excesivă reprezintă un indiciu evident că operează alte mecanisme toxice. În mod similar, ușoare reduceri în creștere, astfel cum sunt stabilite prin greutatea umedă și/sau SVL sugerează, de asemenea, toxicitate netiroidiană. Creșteri aparente ale creșterii sunt de obicei observate în cazul substanțelor chimice care afectează negativ dezvoltarea normală. În consecință, prezența unor animale mai mari nu indică neapărat o toxicitate netiroidiană. Totuși, toxicitatea tiroidiană nu trebuie stabilită niciodată doar pe baza creșterii. Mai degrabă, creșterea, în coroborare cu stadiul de dezvoltare și cu histopatologia tiroidiană, trebuie utilizată pentru a determina activitatea tiroidei. De asemenea, pentru determinarea toxicității evidente, trebuie să fie luați în considerare alți parametri incluzând edemul, leziunile hemoragice, letargia, consumul de produse alimentare redus, comportamentul anormal/modificare a înotului, etc. Dacă toate concentrațiile de testare determină semne de toxicitate evidentă, substanța chimică testată trebuie reevaluată la concentrații de testare mai mici înainte de a determina dacă substanța chimică este potențial activă la nivel tiroidian sau nu are activitate tiroidiană.
62. Întârzierile de dezvoltare semnificative din punct de vedere statistic, în absența altor semne de toxicitate evidentă, indică faptul că substanța chimică are activitate tiroidiană (antagonistă). În absența unor răspunsuri statistice solide, acest rezultat poate fi sporit cu rezultate obținute în urma histopatologiei tiroidiene.

▼ **M6****Analize statistice**

63. Analizele statistice ale datelor ar trebui să urmeze, de preferat, proceduri descrise în documentul „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*” (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind exotoxicitatea: orientări de aplicare) (11). Pentru toți parametri studiați cantitativi continui (HLL SVL, greutate umedă) care prezintă o relație doză-răspuns monotonă trebuie aplicat testul Jonckheere-Terpstra în manieră descrescătoare pentru a stabili existența unui efect semnificativ al tratamentului.
  
64. Pentru parametrii continui care nu sunt compatibili cu o relație doză-răspuns monotonă, datele trebuie să fie evaluate din punctul de vedere al normalității (de preferat cu ajutorul testului Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling) și al omogenității varianței (de preferat cu ajutorul testului Levene). Ambele teste sunt efectuate pe reziduurile de la o ANOVA. Se poate recurge la opinia experților în locul acestor teste formale privind normalitatea și omogenitatea varianței, deși sunt preferate testele formale. În cazul în care se constată o anormalitate sau o eterogenitate a varianței, trebuie căutată o normalizare, o transformare de stabilizare a varianței. În cazul în care datele (probabil după o transformare) sunt distribuite în mod normal cu o varianță omogenă, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Dunnett. În cazul în care datele (probabil după o transformare) sunt distribuite în mod normal cu o varianță eterogenă, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Tamhane-Dunnett sau prin testul T3 sau prin testul Mann-Whitney-Wilcoxon U. În cazul în care nu se poate constata vreo transformare de normalizare, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Mann-Whitney-Wilcoxon U utilizând o ajustare Bonferroni-Holm la valorile p. Testul Dunnett se aplică independent de orice test ANOVA F, iar testul Mann-Whitney se aplică independent de orice test de ansamblu Kruskal-Wallis.
  
65. Nu se preconizează o mortalitate semnificativă, însă aceasta trebuie evaluată prin testul Cochran-Armitage regresiv dacă datele sunt compatibile o relație doză-răspuns monotonă, iar altfel, prin testul Exact al lui Fisher cu o ajustare Bonferroni-Holm.
  
66. Un efect semnificativ al tratamentului asupra stadiului de dezvoltare este determinat prin aplicarea regresivă a testului Jonckheere-Terpstra aplicat medianelor replicilor. În mod alternativ, și de preferat, testul Jonckheere multicuantic de la a 20-a la a 80-a procentilă trebuie să fie utilizat pentru determinarea efectului, deoarece ia în considerare modificările profilului distribuției.
  
67. Unitatea de analiză corespunzătoare este replica, astfel încât datele constau în mediane ale replicilor dacă este utilizat testul Jonckheere-Terpstra sau testul Mann-Whitney U, sau mediile replicilor dacă este utilizat testul Dunnett. Relația monotonă doză-răspuns poate fi evaluată vizual cu ajutorul mediilor sau al medianelor replicilor și tratamentului sau cu ajutorul testelor formale, precum cele descrise anterior (11). În condițiile în care se utilizează sub cinci replici per tratament sau control, versiunile de permutare exacte ale testelor Jonckheere-Terpstra și Mann-Whitney trebuie utilizate dacă sunt disponibile. Semnificația statistică a tuturor testelor indicate este considerată la nivelul de 0,05.
  
68. Figura 4 reprezintă o organigramă pentru efectuarea de teste statistice asupra datelor continue.

Figura 4

## Diagramă a metodelor statistice pentru datele privind răspunsuri continue.



▼ **M6****Considerații speciale privind analiza datelor***Utilizarea nivelurilor de tratament compromise*

69. O serie de factori trebuie luați în considerare pentru a determina dacă o replică sau întregul tratament demonstrează toxicitate evidentă și trebuie excluși din analiză. Toxicitatea evidentă se caracterizează printr-o mortalitate  $> 2$  indivizi în orice replică care nu poate fi explicată decât prin toxicitate și nu printr-o eroare tehnică. Alte semne ale toxicității evidente includ hemoragia, comportamentele anormale, modalitățile anormale de înot, anorexia și orice alt semn clinic de boală. În ceea ce privește semnele subtile de toxicitate, pot fi necesare evaluări calitative care trebuie întotdeauna realizate în raport cu un grup de control dintr-un vas cu apă curată.

*Vase de control cu solvent*

70. Utilizarea unui solvent trebuie avută în vedere ca ultimă soluție, după epuizarea tuturor celorlalte opțiuni de livrare a substanței chimice. În cazul utilizării unui solvent, este imperativă utilizarea unui grup de control într-un vas cu apă curată. La încheierea testului, trebuie efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului. Aceasta se realizează printr-o comparație statistică a grupului de control din vasul cu solvent și a grupului de control din vasul cu apă curată. Cei mai relevanți parametri pentru această analiză sunt stadiul de dezvoltare, SVL și greutatea umedă, deoarece acestea pot fi afectate prin toxicități netiroidiene. În cazul în care sunt constatate diferențe semnificative din punct de vedere statistic ale acestor parametri între grupul de control din vasul cu apă curată și grupul de control din vasul cu solvent, trebuie determinați parametrii studiului pentru măsurătorile răspunsului folosind grupul de control din vasul cu apă curată. Dacă nu se constată diferențe semnificative din punct de vedere statistic între grupul de control din vasul cu apă curată și grupul de control din vasul cu solvent pentru toate variabilele măsurătorilor răspunsului, trebuie determinați parametrii studiului pentru măsurătorile răspunsului utilizând un grupurile de control comasate din vasul cu apă de diluție și din cel cu solvent.

*Grupurile de tratament care ating un stadiu de dezvoltare superior sau egal cu 60*

71. După stadiul 60, mormolocii scad ca dimensiune și greutate ca urmare a resorbției țesuturilor și a reducerii conținutului de apă în valoare absolută. Astfel, măsurarea greutății umede și a lungimii bot-cloacă nu poate fi utilizată în analizele statistice ale diferențelor vitezelor de creștere. Prin urmare, datele referitoare la greutatea umedă și la lungime ale organismelor aflate într-un stadiu NF mai mare de 60 trebuie cenzurate și eliminate din analizele mediilor sau medianelor replicilor. Două metode diferite ar putea fi utilizate pentru a analiza acești parametri de creștere.
72. Una dintre metode constă în luarea în considerare exclusiv a mormolocilor cu stadii de dezvoltare mai mici sau egale cu 60 pentru analizele statistice ale greutății umede și/sau ale lungimii bot-cloacă. Această metodă este considerată a furniza informații suficient de solide cu privire la severitatea posibilelor efecte asupra creșterii, cu condiția ca proporția animalelor de testare excluse din analize să fie mică ( $\leq 20\%$ ). Dacă un număr crescut de mormoloci se caracterizează printr-un stadiu de dezvoltare mai mare decât 60 ( $\geq 20\%$ ) pentru una sau mai multe concentrații nominale, atunci trebuie realizată o structură ANOVA bifactorială cu o varianță ierarhică pentru toți mormolocii pentru a evalua efectele asupra creșterii ale tratamentelor chimice, luând în considerare în același timp efectul stadiului târziu de dezvoltare asupra creșterii. Apendicele 3 furnizează orientări privind analiza ANOVA bifactorială pentru greutate și lungime..

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼ **M6**

- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris
- (4) 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. Paris
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
- (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98
- (7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. & Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
- (8) Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
- (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
- (10) Dodd, M.H.I. & Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
- (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
- (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69–92.

▼ **M6**

## Apendicele 1

Tabelul 1

**Condiții experimentale pentru testul de metamorfoză la amfibieni de 21 de zile**

|  |  |  |
|--|--|--|
| Animale utilizate în test                          | Larve de <i>Xenopus laevis</i>   |  |
| Stadiul larvar inițial                             | Stadiul 51 conform Nieuwkoop și Faber  |  |
| Perioada de expunere                               | 21 de zile   |  |
| Criteriile de selecție a larvelor                  | Stadiul de dezvoltare și lungimea totală (opțional)  |  |
| Concentrațiile de testare                          | Minimum 3 concentrații care acoperă aproximativ un ordin de magnitudine  |  |
| Regimul de expunere                                | Cu flux continuu (preferat) și/sau static cu reînnoire   |  |
| Debitul sistemului de testare                      | 25 ml/min (înlocuirea completă a volumului la aproximativ fiecare 2,7 h)   |  |
| Parametri studiați principali /zile de determinare | Mortalitate  | Zilnic   |
|  | Stadiu de dezvoltare   | Z 7 și 21  |
|  | Lungimea membrelor posterioare   | Z 7 și 21  |
|  | Lungimea bot-cloacă  | Z 7 și 21  |
|  | Greutatea corporală umedă  | Z 7 și 21  |
|  | Histologia glandei tiroide   | Z 21   |
| Apa de diluție/control de laborator                | Apă de robinet declorurată (cu filtru de carbon) sau sursă echivalentă de laborator  |  |
| Densitatea larvelor                                | 20 larve/vas de testare (5/l)  |  |
| Soluție de testare/vas de testare                  | 4– 10 l (10– 15 cm de apă minimum)/vas de testare din sticlă sau din oțel inoxidabil (de exemplu, 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm) |  |
| Replică  | 4 vase-replică de testare/concentrație de testare și control   |  |
| Rată de mortalitate admisă în grupurile de control | ≤ 10 % per vas-replică de testare  |  |
| Fixare tiroidiană                                  | Număr fixat  | Toți mormolocii (5/replică sunt evaluați inițial)              |
|  | Regiune  | Cap sau întregul corp  |
|  | Lichide de fixare  | Fixatorul Davidson   |
| Hrănire  | Hrană  | Sera Micron® sau echivalent                                    |
|  | Cantitate/frecvență  | A se vedea tabelul 1 pentru regimul de hrănire cu Sera Micron® |
| Iluminat   | Perioadă de expunere la lumină   | 12 h lumină: 12 h întuneric                                    |

**▼ M6**

|   |             |  |
|---|-------------|--|
|   | Intensitate | 600 – 2 000 lux (măsurată la suprafața apei) |
| Temperatura apei                              |             | 22° ± 1 °C                                   |
| pH  |             | 6,5 – 8,5                                    |
| Concentrația oxigenului dizolvat (OD)         |             | > 3,5 mg/l (> 40 % saturația în aer)         |
| Program de eșantionare pentru analize chimice |             | O dată/săptămână (4 eșantionări/test)        |

▼ **M6***Apendicele 2***Tabele pentru raportarea datelor brute și de sinteză***Tabelul 1***Informații generale privind substanțele chimice testate**

| Informații privind substanțele chimice |   |  |                                |
|--|---|--|--------------------------------|
|  | A se introduce substanța chimică testată, unitățile concentrațiilor și tratamentele |  |                                |
|  | Substanța chimică testată:  |  |                                |
|  | Unități ale concentrațiilor:  |  |                                |
|  | Tratament 1   |  |                                |
|  | Tratament 2   |  |                                |
|  | Tratament 3   |  |                                |
|  | Tratament 4   |  |                                |
|  |   |  |                                |
|  | Data (ziua 0):  |  | A se introduce data (ll/zz/aa) |
|  | Data (ziua 7):  |  | A se introduce data (ll/zz/aa) |
|  | Data (ziua 21):   |  | A se introduce data (ll/zz/aa) |

*Tabelul 2***Fișe de colectare a datelor primare pentru zilele 7 și 21**

**ZIUA X**  
**DATA 00/00/00**

|      | Concentrație | Număr tratament | Număr replică | Număr individual | Identificator individual | Stadiu de dezvoltare | Lungimea SVL (mm) | Lungimea membrelor posterioare (mm) | Greutatea umedă a întregului organism (mg) |
|------|--------------|-----------------|---------------|------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------------|--|
| RÂND | TRT          | TRT#            | REP           | IND              | ID#                      | STADIU               | BL                | HLL                                 | GREUTATE                                   |
| 1    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 2    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 3    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 4    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 5    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 6    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 7    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |
| 8    | 0,00         | 1               |               |                  |                          |                      |                   |                                     |  |



▼ **M6**

|      | Concentrație | Număr<br>tratament | Număr<br>replică | Număr indi-<br>vidual | Identificator<br>individual | Stadiu de<br>dezvoltare | Lungimea<br>SVL (mm) | Lungimea<br>membrelor<br>posteroare<br>(mm) | Greutatea<br>umedă a<br>întregului<br>organism<br>(mg) |
|------|--------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------|---|--|
| RÂND | TRT          | TRT#               | REP              | IND                   | ID#                         | STADIU                  | BL                   | HLL   | GREUTATE   |
| 9    | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 10   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 11   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 12   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 13   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 14   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 15   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 16   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 17   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 18   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 19   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 20   | 0,00         | 1                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 21   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 22   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 23   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 24   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 25   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 26   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 27   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 28   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 29   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 30   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 31   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 32   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 33   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |

▼ **M6**

|      | Concentrație | Număr<br>tratament | Număr<br>replică | Număr indi-<br>vidual | Identificator<br>individual | Stadiu de<br>dezvoltare | Lungimea<br>SVL (mm) | Lungimea<br>membrelor<br>posteroare<br>(mm) | Greutatea<br>umedă a<br>întregului<br>organism<br>(mg) |
|------|--------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------|---|--|
| RÂND | TRT          | TRT#               | REP              | IND                   | ID#                         | STADIU                  | BL                   | HLL   | GREUTATE   |
| 34   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 35   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 36   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 37   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 38   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 39   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 40   | 0,00         | 2                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 41   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 42   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 43   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 44   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 45   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 46   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 47   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 48   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 49   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 50   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 51   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 52   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 53   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 54   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 55   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 56   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 57   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 58   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |

▼ **M6**

|      | Concentrație | Număr<br>tratament | Număr<br>replică | Număr indi-<br>vidual | Identificator<br>individual | Stadiu de<br>dezvoltare | Lungimea<br>SVL (mm) | Lungimea<br>membrelor<br>posteroare<br>(mm) | Greutatea<br>umedă a<br>întregului<br>organism<br>(mg) |
|------|--------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------|---|--|
| RÂND | TRT          | TRT#               | REP              | IND                   | ID#                         | STADIU                  | BL                   | HLL   | GREUTATE   |
| 59   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 60   | 0,00         | 3                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 61   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 62   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 63   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 64   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 65   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 66   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 67   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 68   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 69   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 70   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 71   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 72   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 73   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 74   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 75   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 76   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 77   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 78   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 79   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |
| 80   | 0,00         | 4                  |                  |                       |                             |                         |                      |   |  |

Tabelul 3

### Sinteze calculate pentru datele parametrilor din zilele 7 și 21

|     |     | Stadiu de dezvoltare |         |     | SVL (mm) |                      | Lungimea membrelor posterioare (mm) |                      | Greutate (mg) |                      |
|-----|-----|----------------------|---------|-----|----------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| TRT | REP | MIN                  | MEDIANĂ | MAX | MEDIE    | STADIU DE DEZVOLTARE | MEDIE                               | STADIU DE DEZVOLTARE | MEDIE         | STADIU DE DEZVOLTARE |
| 1   | 1   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 1   | 2   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 1   | 3   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 1   | 4   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 2   | 1   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 2   | 2   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 2   | 3   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 2   | 4   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 3   | 1   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 3   | 2   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 3   | 3   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 3   | 4   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 4   | 1   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 4   | 2   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 4   | 3   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |
| 4   | 4   | 0                    | #NUM!   | 0   | #DIV/0!  | #DIV/0!              | #DIV/0!                             | #DIV/0!              | #DIV/0!       | #DIV/0!              |

*Notă:* Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 2.

Tabelul 4

### Date privind mortalitatea zilnică

[illegible]

▼ **M6**

| Ziua de testare     | Data      | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6                   | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 7                   | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 8                   | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 9                   | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 10                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 11                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 12                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 13                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 14                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 15                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 16                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 17                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 18                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 19                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 20                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 21                  | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                     |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Număr per replică   |           | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Număr per tratament |           | 0 |   |   |   | 0 |   |   |   | 0 |   |   |   | 0 |   |   |   |

*Notă:* Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 1.

Tabelul 5

**Criterii privind calitatea apei**

Sistemul de expunere (cu flux continuu/static cu reînnoire):

Temperatura:

Intensitatea luminii:

Ciclul lumină-întuneric:

Hrană:

Frecvența hrănirii:

pH-ul apei:

Concentrația de iod în apa utilizată pentru testare

▼ **M6**

Tabelul 6

**Data de sinteză privind substanțele chimice:**

| Denumirea substanței chimice: |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
|-------------------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|
| Cas #:                        |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| Ziua de<br>testare            | Data      | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |  |  |
| 0                             | 00/00/00  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 1                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 2                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 3                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 4                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 5                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 6                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 7                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 8                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 9                             | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 10                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 11                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 12                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 13                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 14                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 15                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 16                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 17                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 18                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 19                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 20                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 21                            | #Valoare! |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |

Notă: Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 1.

▼ **M6**

Tabelul 7:

**Tabele de raportare a histopatologiei pentru criteriile de bază**

Data:

Substanța chimică:

Patolog:

| Control Animal ID –<br>replică 1 |  |  | Hipertrofia<br>glandei tiroide | Atrofia<br>glandei tiroide | Hipertrofia<br>celulelor foliculare | Hiperplazia<br>celulelor foliculare |
|----------------------------------|--|--|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                                  |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
| Total:                           |  |  |                                |                            |                                     |                                     |

| Doză Animal ID –<br>replică 1 |  |  | Hipertrofia<br>glandei tiroide | Atrofia<br>glandei tiroide | Hipertrofia<br>celulelor foliculare | Hiperplazia<br>celulelor foliculare |
|-------------------------------|--|--|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
| Total:                        |  |  |                                |                            |                                     |                                     |

| Doză Animal ID –<br>replică 1 |  |  | Hipertrofia<br>glandei tiroide | Atrofia<br>glandei tiroide | Hipertrofia<br>celulelor foliculare | Hiperplazia<br>celulelor foliculare |
|-------------------------------|--|--|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
| Total:                        |  |  |                                |                            |                                     |                                     |

| Doză Animal ID –<br>replică 1 |  |  | Hipertrofia<br>glandei tiroide | Atrofia<br>glandei tiroide | Hipertrofia<br>celulelor foliculare | Hiperplazia<br>celulelor foliculare |
|-------------------------------|--|--|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
|                               |  |  |                                |                            |                                     |                                     |
| Total:                        |  |  |                                |                            |                                     |                                     |

▼ **M6**

Tabelul 8:

**Criterii histopatologie suplimentare**

Data:

Substanța chimică:

Patolog:

|                               |  |                                     |                                    |
|-------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Control Animal ID – replică 1 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
| Control Animal ID – replică 2 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
|                               |  |                                     |                                    |
| Total:                        |  |                                     |                                    |

|                            |  |                                     |                                    |
|----------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Doză Animal ID – replică 1 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Doză Animal ID – replică 2 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Total:                     |  |                                     |                                    |

|                            |  |                                     |                                    |
|----------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Doză Animal ID – replică 1 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Doză Animal ID – replică 2 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Total:                     |  |                                     |                                    |

|                            |  |                                     |                                    |
|----------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Doză Animal ID – replică 1 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Doză Animal ID – replică 2 |  | Creșterea ariei lumenului folicular | Scăderea ariei lumenului folicular |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
|                            |  |                                     |                                    |
| Total:                     |  |                                     |                                    |



▼ **M6**

Tabelul 9

**Descrieri ale concluziilor histopatologice**

Data:

Substanța chimică:

Patolog:

| Descriere                        |  |  |
|----------------------------------|--|--|
| Control Animal ID –<br>replică 1 |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
| Control Animal ID –<br>replică 2 |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
| Doză Animal ID –<br>replică 1    |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
| Doză Animal ID –<br>replică 2    |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |

▼ **M6**

|                               |  |  |
|-------------------------------|--|--|
| Doză Animal ID –<br>replică 1 |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
| Doză Animal ID –<br>replică 2 |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
| Doză Animal ID –<br>replică 1 |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
| Doză Animal ID –<br>replică 2 |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |
|                               |  |  |

Tabelul 10

Tabel sintetic de raportare pentru ziua x (7 sau 21) a AMA

|  |         | Control |    |    |   | Doza 1 |    |    |   |           | Doza 2 |    |    |   |           | Doza 3 |    |    |   |           |
|--|---------|---------|----|----|---|--------|----|----|---|-----------|--------|----|----|---|-----------|--------|----|----|---|-----------|
| Parametru studiat                          | Replică | Medie   | SD | CV | N | Medie  | SD | CV | N | valoare p | Medie  | SD | CV | N | valoare p | Medie  | SD | CV | N | valoare p |
| <b>Lungimea membrelor posterioare (mm)</b> | 1       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 2       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 3       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 4       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | Medie:  |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
| <b>SVL (mm)</b>                            | 1       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 2       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 3       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 4       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | Medie:  |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
| <b>Greutate umedă (mg)</b>                 | 1       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 2       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 3       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | 4       |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |
|  | Medie:  |         |    |    |   |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |        |    |    |   |           |

Tabelul 11

Model de tabel sintetic de raportare pentru ziua x (7 sau 21) a datelor privind stadiile de dezvoltare pentru testul AMA

|                      |         | Control |       |       |   | Doza 1  |       |       |   |           | Doza 2  |       |       |   |           | Doza 3  |       |       |         |           |
|----------------------|---------|---------|-------|-------|---|---------|-------|-------|---|-----------|---------|-------|-------|---|-----------|---------|-------|-------|---------|-----------|
|                      | Replică | Mediană | Minim | Maxim | N | Mediană | Minim | Maxim | N | valoare p | Mediană | Minim | Maxim | N | valoare p | Mediană | Minim | Maxim | Mediană | valoare p |
| Stadiu de dezvoltare | 1       |         |       |       |   |         |       |       |   |           |         |       |       |   |           |         |       |       |         |           |
|                      | 2       |         |       |       |   |         |       |       |   |           |         |       |       |   |           |         |       |       |         |           |
|                      | 3       |         |       |       |   |         |       |       |   |           |         |       |       |   |           |         |       |       |         |           |
|                      | 4       |         |       |       |   |         |       |       |   |           |         |       |       |   |           |         |       |       |         |           |
|                      | Medie:  |         |       |       |   |         |       |       |   |           |         |       |       |   |           |         |       |       |         |           |

## ▼ M6

## Apendicele 3

**Analiză alternativă a greutatei și a lungimii în caz de stadiu târziu de dezvoltare care afectează peste 20 % dintre mormoloci pentru una sau mai multe concentrații**

Dacă un număr crescut de mormoloci se caracterizează printr-un stadiu de dezvoltare mai mare decât 60 ( $\geq 20\%$ ) pentru una sau mai multe concentrații nominale, atunci trebuie realizată o structură ANOVA bifactorială cu o varianță ierarhică pentru toți mormolocii pentru a evalua efectele asupra creșterii ale tratamentelor chimice, luând în considerare în același timp efectul stadiului târziu de dezvoltare asupra creșterii.

Propunerea este de a utiliza toate datele, dar ținând cont de efectul stadiului târziu de dezvoltare. Aceasta se poate realiza cu o ANOVA bifactorială cu o varianță ierarhică. Se definește *LateStage* = „Da” pentru un animal dacă stadiul său de dezvoltare este 61 sau mai mare. Altfel, se definește *LateStage* = „Nu”. Ulterior, poate fi realizată o ANOVA bifactorială concentrație și *LateStage* și interacțiunea acestora, cu *Rep(Conc)* un factor aleatoriu și *Tadpole(Rep)* alt efect aleatoriu. Aceasta tratează încă *rep* ca unitate de analiză și furnizează, în esență, aceleași rezultate ca o analiză ponderată a mediilor *rep\*latestage*, ponderată cu numărul de animale per medie. Dacă datele încalcă normalitatea sau varianța cerințelor de omogenitate ale ANOVA, atunci poate fi realizată o transformare ierarhizată normalizată pentru îndepărta obiecția.

În plus față de testele standard ANOVA F pentru efectele Conc, *LateStage* și interacțiunile lor, testul F pentru interacțiuni poate fi „divizat” în două teste ANOVA F, unul vizând răspunsurile medii pentru concentrații pentru *LateStage* = „Nu” și altul vizând răspunsurile medii pentru concentrații pentru *LateStage* = „Da”. Comparații suplimentare ale mediilor tratamentelor în raport cu controlul se efectuează în cadrul fiecărui nivel de *LateStage*. O analiză a tipului de tendințe poate fi efectuată utilizând contraste corespunzătoare sau prin comparații simple pe perechi dacă există dovezi ale unei relații doză-răspuns nemonotone în cadrul unui nivel al variabilei *LateStage*. O ajustare Bonferroni-Holm a valorilor p se efectuează numai dacă diviziunea F corespunzătoare nu este semnificativă. Aceasta se poate realiza în SAS și, probabil, cu ajutorul altor pachete de software statistic. Pot apărea complicații atunci când nu există animale în stadiu târziu pentru anumite concentrații, însă aceste situații pot fi gestionare în mod direct.

**▼ M6***Apendicele 4***Definiții**

**Substanța chimică:** o substanță sau un amestec

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec testate prin această metodă de testare.

## ▼ M6

## C.39. TEST DE REPRODUCERE A COLEMBOLELOR ÎN SOL

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 232 (2009). Această metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele substanțelor chimice asupra producției reproductive a colembolilor în sol. Ea se bazează pe procedurile existente (1) (2). Specia *Folsomia candida*, care se reproduce partenogenetic, și specia *Folsomia fimetaria*, care se reproduce sexual, sunt două dintre cele mai accesibile specii de colembole care pot fi cultivate și care sunt disponibile comercial. Atunci când habitate specifice care nu sunt acoperite de aceste două specii trebuie să fie evaluate, procedura poate fi extinsă și la alte specii de colembole, dacă acestea pot îndeplini criteriile de validitate a testului.
2. Colembolele care trăiesc în sol sunt specii relevante din punct de vedere ecologic pentru testarea ecotoxicității. Colembolele sunt hexapode cu un exoschelet subțire foarte permeabil la aer și la apă și reprezintă specii de artropode cu diferite rute și cu diferite rate de expunere în raport cu rămele și cu enchitreidele.
3. Densitățile populațiilor de colembole ating frecvent  $10^5 \text{ m}^{-2}$  în sol și în straturile de frunze în multe ecosisteme terestre (3) (4). Adulții măsoară în mod obișnuit între 0,5 și 5 mm, iar contribuția acestora la biomasa totală a animalelor din sol este mică, fiind estimată a fi cuprinsă între 1 % și 5 % (5). Prin urmare, rolul lor cel mai important poate fi acela de organism cu potențial de reglare a proceselor prin acționând ca prădător de microorganisme și microfaună. Colembolele sunt animale de pradă pentru o mare varietate de nevertebrate endogeice și epigeice precum acarieni, miriapode, păianjeni, carabide și stafilinide. Colembolele contribuie la procesele de descompunere în solurile acide unde e posibil ca ele să fie cele mai importante nevertebrate din sol pe lângă enchitreide, întrucât rămele și diplopodele sunt în general absente.
4. *F. fimetaria* este răspândită în toată lumea și este frecvent întâlnită în mai multe tipuri de sol, de la solul nisipos la solul argilos și de la soluri cu humus neacid (*mull*) la soluri cu humus acid (*mor*). Este o specie de colembolă anoftalmică și nepigmentată. A fost observată în solurile agricole din întreaga Europă (6). Are un obicei de hrănire omnivor, incluzând hife fungice, bacterii, protozoare și resturi. Interacționează în pășuni cu ciuperci patogene pentru plante (7) și pot influența micoriza, după cum se știe că este cazul pentru *F. candida*. La fel ca cea mai mare parte dintre speciile de colembole, ea se reproduce sexual, fiind necesară prezența permanentă a masculilor pentru fertilizarea ouălor.
5. *F. candida* este, de asemenea, răspândită în toată lumea. Deși aceasta nu este frecvent întâlnită în cea mai mare parte a solurilor naturale, ea se întâlnește deseori în număr foarte mare în solurile bogate în humus. Este o specie de colembolă anoftalmică și nepigmentată. Este prevăzută cu o furcă (aparat de sărit) bine dezvoltată, se deplasează repede și sare cu ușurință dacă este perturbată. Rolul ecologic al *F. candida* este similar celui al *F. fimetaria*, însă habitatele sunt constituite din soluri mai bogate în materii organice. Se reproduce prin partenogeneză. Proporția masculilor poate fi mai mică decât 1 la o mie.

## PRINCIPIUL TESTULUI

6. Colembolele sincrone, adulte (*F. fimetaria*) sau tinere (*F. candida*) sunt expuse unui interval de concentrații ale substanțelor chimice testate amestecate într-un sol modificat artificial (8) utilizând conținut organic în proporție de 5 % (sau un sol alternativ). Scenariul de testare poate fi împărțit în două etape:

— Un test de stabilire a intervalului, în cazul în care nu există suficiente informații disponibile privind toxicitatea, în care mortalitatea și

**▼ M6**

reproducerea reprezintă principalii parametri studiați, fiind evaluați după 2 săptămâni pentru *F. fimetaria* și după 3 săptămâni pentru *F. candida*.

- Un test de reproducere definitiv în care sunt evaluate numărul total al colebolelor tinere produse de animalele-părinți și rata de supraviețuire a animalelor-părinți. Durata testului definitiv este de 3 săptămâni pentru *F. fimetaria* sau de 4 săptămâni pentru *F. candida*.

Efectul toxic al substanței chimice testate asupra mortalității și a producției reproductive este exprimat în  $LC_x$  și  $EC_x$ , datele fiind ajustate conform unui model adecvat prin intermediul unei regresii neliniare pentru a estima concentrația care ar cauza o mortalitate de  $x$  % sau, respectiv, scăderea producției reproductive, sau, alternativ, ca valoare NOEC/LOEC (9).

#### INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

7. Ar fi de preferat să se cunoască proprietățile fizice, solubilitatea în apă,  $\log K_{ow}$ , coeficientul de partiție sol-apă și presiunea vaporilor substanței chimice testate. Este de dorit să fie disponibile informații suplimentare privind soarta substanței chimice testate în sol, precum viteza de fotoliză, de hidroliză și de degradare biotică. Identificarea chimică a substanței chimice testate prin denumirea IUPAC, numărul CAS, seria, lotul, formula structurală și puritatea trebuie să fie documentată atunci când este posibil.
8. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței chimice testate va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor chimice în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție între aer-apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea vaporilor depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

#### VALIDITATEA TESTULUI

9. Pentru ca un rezultat al testului să fie considerat valid, grupurile de control netratate trebuie să îndeplinească următoarele criterii:
  - Mortalitatea medie a adulților nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului;
  - Numărul mediu de exemplare tinere per vas trebuie să fie de cel puțin 100 la finalul testului;
  - Coeficientul de variație calculat pentru numărul de exemplare tinere nu trebuie să fie mai mic de 30 % la încheierea testului definitiv.

#### SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

10. O substanță chimică de referință trebuie testată la concentrația ei  $EC_{50}$  pentru tipul de sol ales pentru test, fie la intervale regulate, fie, posibil, inclusă în fiecare efectuare de teste pentru a verifica faptul că răspunsurile organismelor testate în sistemul de testare sunt în limite normale. O substanță chimică de referință adecvată este acidul boric, care ar trebui să reducă reproducerea cu 50 % (10) (11) la o concentrație de aproximativ 100 mg/kg de sol uscat pentru ambele specii.

#### DESCRIEREA TESTULUI

##### Vasele și echipamentele de testare

11. Recipientele adecvate ca vase de testare sunt cele care pot conține 30 g de sol umed. Ele trebuie să fie fabricate din sticlă sau din plastic inert (netoxic). Cu toate acestea, utilizarea de recipiente din plastic trebuie evitată dacă expunerea substanței chimice testate este redusă din cauza absorbției. Vasele de testare trebuie să aibă o secțiunea transversală care să permită o



**▼ M6**

adâncime a solului din vasele de testare de 2 – 4 cm. Vasele trebuie să fie prevăzute cu capace (din sticlă sau polietilenă) concepute astfel încât să reducă evaporarea apei și să permită, în același timp, schimbul gazos între sol și atmosferă. Recipientul trebuie să fie cel puțin parțial transparent pentru a permite trecerea luminii.

12. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă, în mod specific, următoarele:

- dulap pentru uscare;
- microscop stereoscopic;
- pH-metru și luxmetru;
- cântare de precizie adecvate;
- echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;
- echipamente adecvate pentru controlul umidității aerului (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt acoperite cu capace);
- incubator sau o cameră mică cu temperatură controlată;
- forceps sau dispozitiv de aspirare a aerului cu putere mică.

**Pregătirea solului de testare**

13. Pentru testare este utilizat un sol artificial modificat (8) cu un conținut organic de 5 %. În mod alternativ, ar putea fi utilizat un sol natural, întrucât solul artificial nu este asemănător cu solul natural. Compoziția recomandată a solului artificial este următoarea (pe bază de greutate uscată, uscare la 105 °C până la obținerea unei greutăți constante):

- 5 % mușchi de turbă, uscat la aer și măcinat fin (dimensiuni ale particulelor de  $2 \pm 1$  mm) sunt acceptabile);
- 20 % argilă caolinică (conținutul de caolinit este preferabil să fie de peste 30 %);
- aproximativ 74 % nisip industrial uscat la aer (în funcție de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni. Cantitatea exactă de nisip depinde de cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  (a se vedea mai jos), împreună trebuie să reprezinte 75 %.
- 1 % carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, de calitate analitică) pentru a obține un pH de  $6 \pm 0,5$ ; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei (a se vedea Nota 1).

*Nota 1:* Cantitatea de  $\text{CaCO}_3$  necesară va depinde de componentele substratului de sol și trebuie determinată prin măsurarea pH-ului subșanțioanelor de sol umed preincubat imediat înainte de test.

*Nota 2:* Se recomandă măsurarea pH-ului și, opțional, a raportului C/N, a capacității de schimb de cationi (CEC) și a conținutului de materie organică al solului pentru a permite normalizarea într-o etapă ulterioară și o mai bună interpretare a rezultatelor.

*Nota 3:* Dacă este necesar, de exemplu în scopul unor testări specifice, solurile naturale provenite din locuri nepoluate pot servi, de asemenea, ca substrat de testare și/sau de cultură. Cu toate acestea, în cazul în care se utilizează sol natural, acesta trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea sa (locul colectării), pH, textură (distribuția dimensiunii particulelor), CEC și conținutul de materie organică și trebuie să fie necontaminat. În cazul în care se utilizează sol natural, înainte ca acesta să fie utilizat într-un test definitiv, se recomandă demonstrarea faptului că este adecvat pentru a fi utilizat în test și pentru a îndeplini criteriile de validitate a testului.

## ▼ M6

14. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un mixer de laborator de mari dimensiuni). Capacitatea maximă de retenție a apei (*water holding capacity* – WHC) a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 5. Gradul de umezeală a solului de testare trebuie să fie optimizat pentru a se asigura o structură poroasă a solului care să permită colembelor să pătrundă în pori. Acesta înseamnă în general între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei.
15. Solul artificial uscat este preumezit prin adăugarea unei cantități suficiente de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă cu 2-7 zile înainte de începerea testului, pentru a echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și de soluție de clorură de potasiu 1 M (KCl) sau de clorură de calciu 0,01 M (CaCl<sub>2</sub>) într-un raport de 1:5 (în conformitate cu apendicele 6). Dacă aciditatea solului este mai mare decât intervalul necesar, ea poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități adecvate de CaCO<sub>3</sub>. Dacă solul este prea alcalin, el poate fi ajutat prin adăugarea unui acid anorganic nedăunător pentru colembule.
16. Solul preumezit este împărțit în porții corespunzătoare numărului de concentrații de testare (și substanței chimice de referință, dacă este cazul) și controalelor folosite în test. Se adaugă substanțele chimice testate și se ajustează conținutul de apă conform punctului 24.

**Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare**

17. Specia recomandată este *F. candida*, care se reproduce partenogenetic, întrucât în testarea interlaboratoare a metodei de testare (11), această specie îndeplinește criteriile de validitate în materie de supraviețuire mai des decât specia *F. fimetaria*. În cazul utilizării unei specii alternative, ea trebuie să îndeplinească criteriile de validitate menționate la punctul 9. La începutul testului, animalele trebuie să fie bine hrănite și trebuie să aibă o vârstă cuprinsă între 23 și 26 de zile în cazul speciei *F. fimetaria* și între 9 și 12 zile în cazul speciei *F. candida*. Pentru fiecare replică, numărul exemplarelor din specia *F. fimetaria* trebuie să fie de 10 masculi și 10 femele, iar numărul exemplarelor din specia *F. candida* trebuie să fie de 10 femele (a se vedea apendicele 2 și apendicele 3). Pentru fiecare lot adăugat la o replică, animalele cu dezvoltare sincronă sunt selectate în mod aleatoriu din vase, iar starea lor fizică și de sănătate este verificată. Fiecare grup de 10/20 de indivizi este adăugat într-un recipient de testare selectat în mod aleatoriu, iar femelele mari din specia *F. fimetaria* sunt selectate pentru a le putea deosebi mai ușor de masculii din aceeași specie.

**Pregătirea concentrațiilor de testare**

18. Pot fi utilizate patru metode de aplicare a substanțelor chimice testate: 1) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând apa drept căraș; 2) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând un solvent organic drept căraș; 3) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând nisipul drept căraș; sau 4) aplicarea substanței chimice testate pe suprafața solului. Alegerea metodei adecvate depinde de caracteristica substanței chimice și de scopul testului. În general, se recomandă amestecarea substanței chimice testate în sol. Cu toate acestea, pot fi necesare proceduri de aplicare conforme cu utilizarea practică a substanței chimice testate (pulverizarea formulărilor lichide sau utilizarea unor formulări speciale de pesticide, precum granulele sau produsele de tratare a semintelor). Solul este tratat înainte de introducerea colembelor, cu excepția cazului în care substanța chimică testată este adăugată la suprafața solului, colembulele trebuind să intre în sol.

*Substanța chimică testată solubilă în apă*

19. O soluție a substanței chimice testate este pregătită în apă deionizată într-o cantitate suficientă pentru toate replicile cu o concentrație de testare. Fiecare soluție de substanță testată se amestecă bine cu un lot de sol preumezit înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

*Substanța chimică testată insolubilă în apă*

20. În ceea ce privește substanțele chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică testată poate fi dizolvată în cel mai

**▼ M6**

mic volum posibil de solvent adecvat (de exemplu, acetonă) asigurând în continuare amestecarea corespunzătoare a substanței chimice în sol, precum și amestecarea ei cu o porție necesară de nisip de cuarț. Trebuie utilizați numai solvenți volatili. În cazul în care este utilizat un solvent organic, toate concentrațiile de testare și un control negativ cu solvent suplimentar trebuie să conțină aceeași cantitate minimă de solvent. Recipientele pentru aplicare trebuie să fie lăsate descoperite o anumită perioadă de timp pentru a permite solventului asociat cu aplicarea substanței chimice testate să se evapore, asigurându-se că, în acest timp, nu are loc disiparea substanței chimice toxice.

*Substanță chimică testată puțin solubilă în apă și în solvenți organici*

21. În ceea ce privește substanțele chimice puțin solubile în apă și în solvenți organici, nisipul de cuarț, care trebuie să fie o parte din nisipul total adăugat în sol, se amestecă cu cantitatea de substanță chimică testată pentru a obține concentrația de testare dorită. Acest amestec de nisip de cuarț și de substanță chimică testată se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final este distribuit în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, un control corespunzător.

*Aplicarea substanței chimice testate pe suprafața solului*

22. Atunci când substanța chimică testată este un pesticid, poate fi adecvat ca aceasta să fie aplicată pe suprafața solului prin pulverizare. Solul este tratat după adăugarea colembolilor. Recipientele de testare sunt în primul rând umplute cu substratul de sol umezit, apoi se introduc animalele, iar ulterior se cântăresc recipientele de testare. Pentru a evita orice expunere prin contact direct a animalelor la substanța chimică testată, aceasta se aplică la cel puțin jumătate de oră după introducerea colembolilor. Substanța chimică testată trebuie aplicată pe suprafața solului în mod cât mai uniform posibil, cu ajutorul unui dispozitiv de pulverizare de laborator pentru a simula pulverizarea pe teren. Aplicarea trebuie să aibă loc la o temperatură de  $\pm 2$  °C, iar pentru soluțiile apoase, emulsii sau dispersii, cu o rată de aplicare a apei în conformitate cu recomandările de evaluare a riscurilor. Rata trebuie să fie verificată cu ajutorul unei tehnici de calibrare adecvate. Formulările speciale, precum granulele sau produsele de tratare a semințelor, ar putea fi aplicate într-un mod similar cu modul de aplicare în agricultură. Hrana este adăugată după pulverizare

## PROCEDURA

### Condițiile de testare

23. Temperatura medie de testare trebuie să fie de  $20 \pm 1$  °C, cu un interval de temperatură de  $20 \pm 2$  °C. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în aria în care se află vasele de testare.
24. Pentru a verifica umiditatea solului, vasele sunt cântărite la începutul, la jumătatea și la sfârșitul testului. Orice pierdere de greutate de  $> 2\%$  este compensată prin adăugarea de apă deionizată. Trebuie remarcat că pierderea de apă poate fi redusă prin menținerea unei umidități mari a aerului ( $> 80\%$ ) în incubatorul de testare.
25. pH-ul trebuie măsurat la începutul și la sfârșitul testului de stabilire a intervalului și ale testului definitiv. Măsurătorile trebuie să fie realizate într-un eșantion de control suplimentar și într-un eșantion suplimentar al eșantioanelor de sol tratate (toate concentrațiile) pregătite și menținute în același mod ca în culturile de testare, dar fără adăugarea de colembol.

### Procedură de testare și măsurători

26. Pentru fiecare concentrație de testare, o cantitate de sol de testare corespunzătoare unei cantități de 30 g de greutate umedă este plasată în vasul de

▼ **M6**

testare. Sunt pregătite, de asemenea, controale de apă, fără substanța chimică testată. În cazul utilizării unui vehicul pentru aplicarea substanței chimice testate, o serie de control care conține doar vehiculul trebuie să fie realizată în plus față de seria de testare. Concentrația solventului sau a agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele de testare care conțin substanța chimică testată.

27. Colembolele individuale sunt transferate cu atenție în fiecare vas de testare (alocate în mod aleatoriu vaselor de testare) și sunt plasate pe suprafața solului. Pentru un transfer eficient al animalelor, poate fi utilizat un dispozitiv de aspirare a aerului cu putere mică. Numărul de replici pentru concentrațiile de testare și pentru controale depinde de protocolul testului utilizat. Vasele de testare sunt poziționate în mod aleatoriu în incubatorul de testare, respectivele poziții fiind modificate aleator săptămânal.
28. Pentru testul cu *F. fimetaria* trebuie să se utilizeze douăzeci de adulți per vas de testare, 10 masculi și 10 femele, cu vârste cuprinse între 23 și 26 de zile. În ziua 21, colembotele sunt extrase din sol și numărate. Pentru *F. fimetaria* genul este determinat în funcție de dimensiuni în lotul de animale cu dezvoltare sincronă utilizate pentru testare. Femelele sunt evident mai mari decât masculii (a se vedea apendicele 3).
29. Pentru testul cu *F. candida* trebuie utilizate zece exemplare tinere, cu vârsta de 9–12 zile, per vas de testare. În ziua 28, colembotele sunt extrase din sol și numărate.
30. Ca sursă adecvată de hrană, o cantitate suficientă, și anume 2 – 10 mg de drojdie uscată granulată, disponibilă în comerț pentru uz casnic, se adaugă în fiecare recipient la începutul testului și după aproximativ 2 săptămâni.
31. La sfârșitul testului, sunt evaluate mortalitatea și reproducerea. După 3 săptămâni (*F. fimetaria*) sau după 4 săptămâni (*F. candida*), colembotele sunt extrase din solul de testare (a se vedea apendicele 4) și numărate (12). O colembolă este înregistrată ca fiind moartă dacă nu este prezentă în extracție. Metoda de extragere și numărare trebuie să fie validate. Validitatea include eficiența extracției exemplarelor tinere mai mare de 95 %, de exemplu prin adăugarea unui număr cunoscut de exemplare în sol.
32. Rezumatul practic și calendarul procedurii de testare sunt descrise în apendicele 2.

### **Protocolul testului**

#### *Testul de stabilire a intervalului*

33. Atunci când este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații ale substanțelor chimice testate de 0,1, 1, 10, 100 și 1 000 mg/kg greutate uscată a solului și două replici pentru fiecare tratament și control. Informații suplimentare, provenite din teste cu substanțe chimice similare sau din literatura de specialitate, privind mortalitatea sau reproducerea colembotelelor pot fi de asemenea utile în alegerea intervalului concentrațiilor care urmează să fie utilizate în testul de stabilire a intervalului.
34. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni pentru *F. fimetaria* și de 3 săptămâni pentru *F. candida* pentru a asigura producerea unei serii de exemplare tinere. La sfârșitul testului, sunt evaluate mortalitatea și reproducerea colembotelelor. Numărul adulților și apariția exemplarelor tinere trebuie înregistrate.

#### *Testul definitiv*

35. Pentru stabilirea valorii  $EC_x$  (de exemplu,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ), trebuie testate douăsprezece concentrații. Se recomandă cel puțin două replici pentru fiecare concentrație de testare și șase replici de control. Factorul de spațiere poate varia în funcție de tipul de relație doză-răspuns.

## ▼ M6

36. Pentru stabilirea NOEC/LOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru replici pentru fiecare concentrație de testare și opt controale. Concentrațiile trebuie să fie spațiate printr-un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.
37. O metodă combinată permite determinarea valorilor NOEC/LOEC și EC<sub>x</sub>. Pentru această metodă combinată, trebuie utilizate opt concentrații de tratament într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru replici pentru fiecare tratament și opt controale. Concentrațiile trebuie să fie spațiate printr-un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.
38. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere poate fi realizat ca test limită utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg și controlul. Un test limită va oferi posibilitatea de a demonstra că nu există un efect semnificativ din punct de vedere statistic la concentrația limită. Trebuie utilizate opt replici atât pentru solul tratat, cât și pentru control.

## DATE ȘI RAPORTARE

**Tratamentul rezultatelor**

39. Producția reproductivă reprezintă principalul parametru studiat (de exemplu numărul de exemplare tinere produse per vas de testare). Analiza statistică, de exemplu procedurile ANOVA, compară tratamentele prin intermediul testelor Student t, Dunnett sau Williams. Intervalul de încredere de 95 % se calculează pentru mediile tratamentelor individuale.
40. Numărul de adulți supraviețuitori din vasele de control netratate reprezintă un criteriu de validitate important și trebuie documentat. Ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne nocive trebuie înregistrate și în raportul final.

*LC<sub>x</sub> și EC<sub>x</sub>*

41. Valorile EC<sub>x</sub>, inclusiv limitele lor de încredere de 95 % inferioară și superioară corespunzătoare parametrului se calculează utilizând metode statistice adecvate (de exemplu, funcția logistică sau Weibull, metoda Spearman-Kärber simplificată sau simpla interpolare). O valoare EC<sub>x</sub> se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare la x % din media controalelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC<sub>50</sub> sau a oricărei alte valori EC<sub>x</sub>, seturile de date complete trebuie supuse unei analize de regresie. LC<sub>50</sub> este de obicei estimată prin analiza *probit* sau o analiză similară care ține cont de datele privind mortalitatea distribuite binominal.

*NOEC/LOEC*

42. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecă vas este considerat o replică). Trebuie utilizate metode statistice adecvate conform Documentului 54 al OCDE intitulat „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*” (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind exotoxicitatea: orientări de aplicare) (9). În general, efectele adverse ale substanței chimice testate în raport cu controlul sunt analizate utilizând testarea unilaterală a ipotezei la  $p \leq 0,05$ .
43. Distribuția normală și omogenitatea varianței pot fi testate cu ajutorul unui test statistic adecvat, de exemplu testul Shapiro-Wilk și, respectiv, testul Levene ( $p \leq 0,05$ ). Se pot efectua o analiză a varianței unidirecțională

**▼ M6**

(ANOVA) și teste multicomparative ulterioare. Comparatiile multiple (de exemplu, testul Dunnett) sau testele tendinței regresive (de exemplu, testul Williams) pot fi utilizate pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ( $p \leq 0,05$ ) între controale și diversele concentrații de substanță chimică testată [selectarea testului recomandat conform Documentului 54 al OCDE (9)]. În caz contrar, ar putea fi utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul Bonferroni U conform testului tendinței regresive Holm sau Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

*Test limită*

44. În cazul în care a fost efectuat un test imită (compararea controlului cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), pot fi evaluate răspunsurile metrice prin intermediul testului Student (testul t). Se poate utiliza testul t pentru varianțe inegale (testul Welch t) sau un test neparametric, precum testul Mann-Whitney u, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe.
45. Pentru determinarea diferențelor semnificative între controale (control și control cu solvent), replicile fiecărui control pot fi testate conform descrierilor pentru testul limită. În cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate replicile cu control și control cu solvent pot fi comasate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu controlul cu solvent.

**Raportul privind testul**

46. Raportul privind testul trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

*Substanța chimică testată*

- identitatea substanței chimice testate, lotul de fabricație, lotul de ambalare și numărul CAS, puritatea;
- proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate [de exemplu, log Kow, solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, constanta Henry (H) și, de preferință, informații privind soarta substanței chimice testate în sol], dacă sunt disponibile;
- formularea substanței chimice testate și a aditivilor trebuie specificate dacă nu este testată substanța chimică pură;

*Organismele testate*

- identificarea speciilor și a furnizorului organismelor testate, descrierea condițiilor de reproducere și intervalul de vârstă al organismelor testate;

*Condițiile de testare*

- descrierea protocolului și a procedurii experimentale;
- detalii privind pregătirea solului de testare; specificații detaliate în cazul în care se utilizează sol natural (origine, istoric, distribuția dimensiunii particulelor, pH, conținut de materie organică);
- capacitatea solului de retenție a apei;
- descrierea tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice testate în sol;
- condiții de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;
- o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;
- pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și la sfârșitul testului (control și fiecare tratament);
- o descriere detaliată a metodei de extracție și eficiența extracției;

▼ **M6***Rezultatele testului*

- numărul de exemplare tinere determinat în fiecare vas de testare la sfârșitul testului;
- numărul de exemplare adulte și rata mortalității în rândul acestora ( %) în fiecare vas de testare la sfârșitul testului;
- o descriere a simptomelor fiziologice sau patologice evidente sau schimbările evidente de comportament;
- rezultatele obținute cu substanța chimică testată de referință;
- valorile NOEC/LOEC, LC<sub>x</sub> pentru mortalitate și EC<sub>x</sub> pentru reproducere (în principal LC<sub>50</sub>, LC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> și EC<sub>10</sub>) împreună cu intervalele de încredere de 95 %. Un grafic al modelului ajustat folosit în calcule, ecuația funcției sale și parametrii acestuia [a se vedea alineatul (9)];
- toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor;
- puterea testului efectiv dacă se realizează testarea ipotezei (9);
- abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului;
- validitatea testului;
- pentru NOEC, dacă este estimată, diferența minimală detectabilă.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneva
- (3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- (8) Chapter C.36 of this Annex, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

**▼ M6**

- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.



**▼ M6***Apendicele 1***Definiții**

Următoarele definiții se aplică acestei metode de testare (în cadrul acestui test, toate concentrațiile pentru care se observă efecte sunt exprimate ca masă a substanței chimice testate raportată la masa uscată a solului de testare):

**Substanța chimică** este o substanță sau un amestec.

**NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect)** înseamnă concentrația substanței chimice testate în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu controlul.

**LOEC (concentrația cea mai mică la care este observat un efect)** reprezintă concentrația cea mai mică a substanței chimice testate care are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu controlul.

**EC<sub>x</sub> (concentrație la care se observă x % efect)** înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor testate pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu un control. De exemplu, o EC<sub>50</sub> reprezintă o concentrație pentru care se estimează că determină un efect asupra unui parametru studiat în test la 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite.

**Substanța chimică testată** este orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼ **M6***Apendicele 2***Principalele acțiuni și calendarul pentru realizarea unui test asupra colembulelor**

Etapale testului pot fi rezumate după cum urmează:

| Timp (zile) | Acțiune   |
|-------------|---|
| – 23 – – 26 | Pregătirea culturii de <i>F. fimetaria</i> cu dezvoltare sincronă   |
| – 14        | Pregătirea solului artificial (amestecul de constituenți uscați)<br>Se verifică pH-ul solului artificial și se ajustează în consecință<br>Se măsoară WHC maximă a solului   |
| – 9 – – 12  | Pregătirea culturii de <i>F. candida</i> cu dezvoltare sincronă   |
| – 2 – – 7   | Se preumezește solul  |
| – 1         | Se distribuie exemplarele tinere în loturi<br>Se prepară soluțiile stoc și se aplică substanța chimică testată dacă solventul este necesar  |
| 0           | Se prepară soluții stoc și se aplică substanța chimică testată dacă este necesară aplicarea de substanțe chimice solide, solubile în apă sau pe suprafață.<br>Se măsoară pH-ul solului și se cântăresc recipientele.<br>Se adaugă hrană. Se introduc colembulele.                                     |
| 14          | Test de determinare a intervalului <i>F. fimetaria</i> : Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate)<br>Testele definitive: Se măsoară conținutul de umiditate și se realimentează cu apă și se adaugă 2 – 10 mg de drojdie                       |
| 21          | Test definitiv pentru <i>F. fimetaria</i> : Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate)<br>Test de determinare a intervalului <i>F. candida</i> : Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate) |
| 28          | Test definitiv pentru <i>F. candida</i> : Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate)   |

▼ **M6***Apendicele 3***Orientări pentru creșterea și sincronizarea *F. fimetaria* și a *F. candida***

Timpii și duratele indicate în aceste orientări trebuie verificate pentru fiecare tulpină specifică de colembol pentru a se asigura exemplare tinere suficient de sincronizate. În principiu, incidența depunerii ouălor după ce adulții sunt transferați în substrat proaspăt și eclozarea ouălor determină ziua adecvată pentru colectarea ouălor și a exemplarelor tinere sincrone.

Se recomandă dispunerea în permanență de o cultură stoc care să conțină de exemplu 50 de recipiente/placă Petri. Cultura stoc trebuie să fie menținută în bune condiții de hrănire prin hrănire săptămânală, alimentare cu apă și îndepărtarea hranei vechi și a cadavrelor. Prea puține colembol pe substrat pot conduce la inhibare printr-o creștere mai accentuată a fungilor. Dacă cultura stoc este utilizată prea des pentru producerea de ouă, ea riscă să devină mai ineficientă. Semnele de ineficiență sunt adulți morți și prezența fungilor pe substrat. Ouăle rămase în urma producerii de animale sincrone pot fi folosite pentru a reînțineri cultura.

Într-o cultură sincronizată de *F. fimetaria*, masculii se disting de femele mai ales prin dimensiune. Masculii sunt în mod clar mai mici decât femelele, iar viteza de deplasare a masculilor este mai mare decât cea a femelelor. Selectarea corectă a genului necesită puțină practică și poate fi confirmată prin inspecția microscopică a zonei genitale (13).

**1. Creșterea****1.a. Pregătirea substratului de cultură**

Substratul de cultură este constituit din ipsos de Paris (sulfat de calciu) și cărbune activ. Se obține astfel un substrat umed, funcția cărbunelui fiind cea de a absorbi gazele și excrementele (14) (15). Pentru a facilita observația colembolilor pot fi utilizat diferite forme de cărbune. De exemplu, pulberea de cărbune este utilizată pentru *F. candida* și *F. fimetaria* (producând un ipsos de Paris negru/gri).

Constituenții substratului:

- 20 ml de cărbune activ
- 200 ml de apă distilată
- 200 ml de ipsos de Paris

**sau**

- 50 g de cărbune activ pulverizat
- 260 – 300 ml de apă distilată
- 400 g de ipsos de Paris

Amestecul de substrat se lasă să se așeze înainte de utilizare.

**1.b. Reproducerea**

Colembolile sunt ținute în recipiente precum placa Petri (90 mm × 13 mm) cu fundul acoperit cu un strat de ipsos/substrat de cărbune de 0,5 cm. Ele sunt cultivate la  $20 \pm 1$  °C la un ciclu lumină-întuneric de 12 – 12 ore (400 – 800 lux). Recipientele sunt menținute în permanență umede, asigurându-se că umiditatea relativă a aerului din recipient este de 100 %. Aceasta poate fi garantată prin prezența apei libere în ipsosul poros, dar cu evitarea generării unui film de apă pe suprafața ipsosului. Pierderea de apă poate

▼ **M6**

fi prevenită prin asigurarea unui aer ambiant umed. Toți indivizii morți trebuie să fie îndepărtați din recipiente, la fel ca și hrana mucegăită. Pentru a stimula producția de ouă este necesar ca exemplarele adulte să fie transferate în plăci Petri prevăzute cu ipsos de Paris/substrat de cărbune proaspăt pregătit.

1.c. *Sursa de hrană*

Drojdia uscată granulată este folosită ca unică sursă de hrană pentru ambele specii, *F. candida* și *F. fimetaria*. Hrana proaspătă este administrată o dată sau de două ori pe săptămână, pentru a evita mucegăirea acesteia. Ea este plasată direct pe ipsosul de Paris sub forma unei mici grămezi. Masa de drojdie adăugată trebuie să fie ajustată în funcție de dimensiunea populației de colebole, însă, în general, o cantitate de 2 – 15 mg este suficientă.

2. **Sincronizarea**

Testul trebuie efectuat cu exemplare sincronizate pentru a obține animale de testare omogene în stadiu și cu dimensiuni identice. În plus, sincronizarea permite deosebirea masculilor și a femelelor de *F. fimetaria* începând cu vârsta de 3 săptămâni și ulterior pe baza dimorfismului sexual, adică a diferențelor de dimensiune. Procedura de mai jos reprezintă o sugestie privind modul în care se pot obține animale sincronizate (etapele practice sunt opționale).

2.a. *Sincronizarea.*

- Se pregătesc recipiente cu un strat de ipsos de Paris/substrat de cărbune de 0,5 cm.
- Pentru depunerea de ouă, se transferă 150 – 200 de adulți de *F. fimetaria* și 50 – 100 de adulți de *F. candida* din cele mai bune 15 – 20 de recipiente cu cultură stoc cu substrat vechi de 4 – 8 săptămâni și se hrănesc cu 15 mg de drojdie. Trebuie evitată comasarea exemplarelor tinere și a adulților, deoarece exemplarele tinere pot inhiba producerea de ouă.
- Mediul de cultură se menține la  $20 \pm 1$  °C (media trebuie să fie de 20 °C) și la un ciclu de lumină-întuneric de 12 – 12 ore (400 – 800 lux). Se asigură că este disponibilă hrană proaspătă și că aerul este saturat cu apă. Lipsa de hrană poate determina animalele să elimine materialele fecale pe ouă, acest lucru având ca rezultat dezvoltarea de fungi pe ouă sau *F. candida* își poate canibaliza propriile ouă. După 10 zile, ouăle sunt colectate cu grijă cu ajutorul unui ac și al unei spatule și sunt mutate în „cofraje de ouă” (bucăți mici de hârtie de filtru imersate în ipsos de Paris/suspensie de cărbune) care sunt plasate într-un recipient cu un substrat proaspăt de ipsos/cărbune. Câteva granule de drojdie sunt adăugate substratului pentru a atrage exemplarele tinere și pentru a le determina să părăsească cofrajele de ouă. Este important ca atât cofrajele de ouă cât și substratul să fie umede, altfel ouăle se vor deshidrata. Ca alternativă, animalele adulte pot fi îndepărtate din cutiile de cultură de sincronizare după ce produc ouă timp de 2 sau 3 zile.
- După trei zile, cea mai mare parte a ouălor din cofraje vor fi eclozate și sub cofraj pot fi găsite exemplare tinere.
- Pentru a avea exemplare tinere de aceeași vârstă, cofrajele cu ouă neeclozate se îndepărtează din placa Petri cu forcepsul. Exemplarele tinere, de 0 – 3 zile, rămân în placă și sunt hrănite cu drojdie. Ouăle neeclozate sunt eliminate.
- Ouăle și exemplarele tinere eclozate se cultivă în același mod ca exemplarele adulte. În special pentru *F. fimetaria* trebuie luate următoarele măsuri: se asigură hrană proaspătă suficientă, îndepărtarea hranei vechi mucegăite, după 1 săptămână exemplarele tinere sunt împărțite în noi plăci Petri cu condiția ca densitatea să fie de peste 200.

▼ **M6****2.b. Manipularea colembolilor la începerea testului**

- Se colectează exemplare de *F. candida* cu vârste cuprinse între 9 și 12 zile și de *F. fimetaria* cu vârste cuprinse între 23 și 26 de zile, de exemplu prin aspirare, și sunt eliberate într-un recipient de mici dimensiuni cu un substrat de ipsos/cărbune umed, starea lor fizică fiind verificată cu ajutorul unui microscop binocular (animalele lezate sau deteriorate sunt eliminate). Toate etapele trebuie realizate în condiții de menținere a colembolilor într-o atmosferă umedă, pentru a evita stresul cauzat de uscare, de exemplu, prin utilizarea de suprafețe umezite, etc.
- Recipientul se răstoarnă și se lovește ușor pentru a transfera colembolile pe sol. Electricitatea statică trebuie neutralizată, în caz contrar animalele pot zbura în aer sau pot rămâne pe partea laterală a containerului de testare și se pot usca. Pentru neutralizare poate fi folosit un ionizator sau o pânză umedă sub recipient.
- Hrana trebuie răspândită pe toată suprafața solului și nu plasată ca o singură grămadă.
- În timpul transportului și în timpul perioadei de testare trebuie să se evite lovirea sau perturbarea în alt mod fizic a recipientelor de testare, deoarece se poate crește compactarea solului și se poate împiedica interacțiunea dintre colembolile.

**3. Specii de colembolile alternative**

Conform acestei metode de testare, pot fi selectate alte specii de colembolile pentru testare, precum *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Înainte de utilizarea speciilor alternative, trebuie îndeplinite o serie de condiții prealabile:

- Ele trebuie să fie identificate fără echivoc;
- Trebuie furnizată argumentația care stă la baza selectării respectivelor specii;
- Trebuie să se asigure că biologia de reproducere este inclusă în faza de testare și că astfel va fi o țintă potențială în timpul expunerii;
- Trebuie cunoscut ciclul biologic de viață: vârsta la maturitate, durata dezvoltării ouălor și stadiile care fac obiectul expunerii;
- Condițiile optime de creștere și de reproducere trebuie asigurate de substratul de testare și de aprovizionarea cu hrană;
- Variabilitatea trebuie să fie suficient de mică pentru o estimare precisă și exactă a toxicității.

▼ **M6***Apendicele 4***Extragerea și numărarea animalelor****1. Pot fi aplicate două metode de extragere.**

1.a. Prima metodă: Poate fi utilizat un extractor cu gradient de temperatură controlat, pe baza principiilor MacFadyen (1). Căldura care provine de la un element de încălzire situat în partea superioară a cutiei de extragere (reglată printr-un termistor plasat pe suprafața eșantionului de sol). Temperatura din lichidul răcit care înconjoară vasul de colectare este reglată printr-un termistor plasat la suprafața cutiei de colectare (sub miezul solului). Termistorele sunt conectate la o unitate de controlare programabilă care crește temperatura în funcție un calendar preprogramat. Animalele sunt colectate în cutia de colectare răcită (2 °C) care este prevăzută pe fund cu un strat din ipsos de Paris/cărbune. Extragerea este începută la 25 °C, temperatura fiind crescută automat la fiecare 12 ore cu 5 °C, ea durând în total 48 de ore. După 12 ore la 40 °C extragerea este finalizată.

1.b. A doua metodă: După perioada de incubare experimentală se evaluează prin flotație numărul de colembulelor tinere prezente. În acest scop, testul se efectuează în vase cu un volum de aproximativ 250 ml. La sfârșitul testului, se adaugă aproximativ 200 ml de apă distilată. Solul este agitat ușor cu o pensulă fină pentru a permite colembulelor să plutească la suprafața apei. O cantitate mică, de aproximativ 0,5 ml de vopsea Kentmere neagră fotografică poate fi adăugată în apă pentru a ajuta la numărare prin creșterea contrastului dintre apă și colembulele albe. Vopseaua nu este toxică pentru colembule.

**2. Numărarea:**

Numărarea se poate face cu ochiul liber sau sub un microscop optic cu ajutorul unei grile plasate deasupra vasului de plutire sau prin fotografierea suprafeței fiecărui vas și numărarea ulterioară a colembulelor pe imagini tipărite mărite sau imagini proiectate. Numărarea poate fi realizată și cu ajutorul tehnicilor digitale de prelucrare a imaginilor (12). Toate tehnicile trebuie să fie validate.

▼ **M6***Apendicele 5***Determinarea WHC maxime a solului**

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei (WHC) este considerată a fi una adecvată. Ea este descrisă în anexa C din ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction). [Calitatea solului – Efectele poluanților asupra rămelor (*Eisenia fetida*). Partea 2: Determinarea efectelor asupra reproducerii].

Se colectează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru umedă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până când nivelul apei depășește nivelul solului. El trebuie apoi lăsat în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât nu toată apa absorbită de capilarele solului poate fi reținută, eșantionul de sol trebuie lăsat să dreneze timp de două ore prin plasarea tubului pe un pat de nisip de cuarț fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea). Eșantionul trebuie apoi să fie cântărit, uscat până la masa constantă la 105 °C. Capacitatea de retenție a apei (*water holding capacity* – WHC) se calculează după cum urmează:

$$\text{WHC (în \% de masă uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S= masa substratului saturat cu apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T= tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D= masa uscată a substratului

**▼ M6***Apendicele 6***Determinarea pH-ului solului**

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Calitatea solului – Determinarea pH-ului.

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie de sol (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M de puritate analitică. Suspensia este apoi agitată puternic timp de cinci minute, apoi se lasă să se decanteze timp de cel puțin 2 de ore, dar nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost etalonat înainte de fiecare măsurătoare folosind o serie de soluții tampon adecvate (de exemplu, pH 4 și 7).



## ▼M6

**C.40. TEST DE TOXICITATE PE CHIRONOMIDE CARE CUPRINDE CICLUL DE VIAȚĂ DESFĂȘURAT ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT UTILIZÂND APĂ ADIȚIONATĂ SAU SEDIMENT ADIȚIONAT**

**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 233 (2010). Este concepută pentru a evalua efectele expunerii pe tot parcursul vieții a substanțelor chimice asupra *Chironomus* sp., un dipter de apă dulce, acoperind complet prima generație (generația P) și prima parte a celei de a 2-a generații (generația F1). Metoda este o extindere a metodelor de testare C.28 (1) sau C.27 (15) existente în cadrul unui scenariu de expunere la apă aditionată sau, respectiv, la sediment aditionat. Ia în considerare actualele protocoale de testare a toxicității pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus dilutus* [denumit anterior *C. tentans* (2)], care au fost dezvoltate în Europa și în America de Nord (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) și ulterior supuse unor testări interlaboratoare (1) (7) (10) (11) (12). Se pot utiliza și alte specii de chironomide bine documentate, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Durata completă de expunere este de circa 44 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de circa 100 de zile pentru *C. dilutus*.
2. Ambele scenarii de expunere, la apă și la sediment, sunt descrise în această metodă de testare. Selectarea unui scenariu de expunere adecvat depinde de aplicarea preconizată a testului. Scenariul de expunere la apă, care implică aditionarea coloanei de apă, este menit să simuleze o pulverizare cu pesticide și acoperă concentrația maximă inițială în apele de suprafață. Apa aditionată este utilă și pentru alte tipuri de expunere (inclusiv deversări de substanțe chimice), dar nu și pentru procesele de acumulare în sediment cu o durată mai mare decât durata testării. În acest caz, dar și în cazul în care deversarea reprezintă principala cale de intrare a pesticidelor în acumulările de apă, poate fi mai adecvat un test cu sediment aditionat. Dacă sunt avute în vedere alte scenarii de expunere, protocolul de testare poate fi adaptat cu ușurință. De exemplu, dacă distribuția substanței chimice testate între faza apoasă și stratul de sediment nu este de interes și dacă absorbția în sediment trebuie să fie redusă la minimum, poate fi luată în considerare utilizarea unui sediment artificial surogat (de exemplu, nisip de cuarț).
3. Substanțele chimice care necesită testarea organismelor care trăiesc în sedimente pot persista în sediment un timp îndelungat. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse prin mai multe căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectul toxic general, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele chimice puternic absorbante sau pentru substanțele chimice care se leagă covalent de sediment, ingerarea de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor chimice puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate (a se vedea punctul 31). Prin urmare, este posibil să se includă toate căile de expunere și toate etapele de viață.
4. Parametri studiați măsurați sunt numărul total de adulți eclozați (pentru prima și a doua generație), rata de dezvoltare (pentru prima și a doua generație), raportul sexelor adulților eclozați și vii (pentru prima și a doua generație), numărul de șiraguri de ouă per femelă (doar prima generație) și fertilitatea șiragurilor de ouă (doar prima generație).
5. Sedimentul formulat este foarte recomandat. Sedimentul formulat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:

▼ **M6**

- variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea găsirii de surse de sedimente necontaminate și curate;
- testele pot fi inițiate în orice moment, fără a întâmpina problema variabilității sezoniere în sedimentul de testare și nu este necesară pretratarea sedimentului pentru a elimina fauna indigenă;
- reducerea costului în raport cu costul necesar pentru colectarea pe teren de cantități suficiente necesare pentru testarea de rutină;
- sedimentul formulat permite comparații ale toxicității între studii și clasificarea substanțelor chimice în consecință (3).

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

#### PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomidele în primul stadiu larvar sunt expuse la o gamă de concentrații de substanță chimică testată într-un sistem apă-sediment. Testul începe prin introducerea chironomidelor în primul stadiu larvar (prima generație) în pahare de laborator pentru testare care conțin sediment adăugat sau, alternativ, substanța chimică testată este adăugată în apă după introducerea larvelor. Sunt evaluate eclozarea chironomidelor, timpul până la eclozare și raportul sexelor chironomidelor complet eclozate și vii. Adulții eclozați sunt transferați în cuști de reproducere, pentru a facilita formarea roiurilor, împerecherea și depunerea ouălor. Sunt evaluate numărul de șiraguri de ouă produse și fertilitatea lor. Din aceste șiraguri de ouă, se obțin larve în primul stadiu din a 2-a generație. Aceste larve sunt introduse în pahare de laborator proaspăt pregătite (procedură de adăugare la fel ca în cazul primei generații) pentru a determina viabilitatea celei de a 2-a generații prin evaluarea eclozării lor, a timpului până la eclozare și a raportului sexelor chironomidelor complet eclozate și vii (o prezentare schematică a testului care cuprinde ciclul de viață este furnizată în apendicele 5). Toate datele sunt analizate fie printr-un model de regresie pentru a estima concentrația care ar conduce la reducerea cu X % a parametrului studiat relevant, fie prin testarea ipotezei pentru a determina o concentrație fără efecte observate (NOEC). Cea din urmă implică compararea răspunsurilor la tratament cu răspunsurile controlului adecvat cu ajutorul unor teste statistice. Trebuie remarcat faptul că în scenariul bazat pe apa adăugată, în cazul substanțelor chimice cu degradare rapidă, ultimele stadii ale ciclului viață al fiecărei generații (de exemplu, faza pupală) ar putea fi expuse la un nivel al concentrației considerabil mai redus în apa acoperitoare în raport cu chironomidele în primul stadiu larvar. Dacă aceasta reprezintă o preocupare și dacă este necesar un nivel de expunere comparabil pentru fiecare stadiu de viață, ar putea fi luate în considerare următoarele modificări ale metodei de testare:

- testări paralele cu adăugare în diferite stadii de viață sau
- adăugare repetată (sau înnoirea apei acoperitoare) a sistemului de testare pe durata ambelor etape de testare (prima și a 2-a generație), prin care intervalele de adăugare (de înnoire) trebuie să fie ajustate la caracteristicile sorții substanței chimice testate.

Astfel de modificări sunt fezabile doar în scenariul bazat pe apă adăugată, dar nu și în cel bazat pe sediment adăugat.

#### INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să fie cunoscute solubilitatea în apă a substanței chimice testate, presiunea vaporilor ei și  $\log K_{ow}$  măsurat sau calculat în sediment, precum și stabilitatea ei în apă și în sediment. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței chimice testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție să fie cunoscute și raportate. Informații utile

## ▼ M6

incluând formula structurală și puritatea substanței chimice testate. De asemenea, este util să se cunoască soarta chimică a substanței chimice testate (de exemplu, disiparea, degradarea abiotică și biotică etc.). Orientări suplimentare privind testarea substanțelor chimice cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (16).

## SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic pentru a se asigura că sensibilitatea populației de laborator nu s-a schimbat. La fel ca în cazul dafniilor, ar fi suficientă efectuarea unui test al toxicității acute de 48 de ore (conform 17). Cu toate acestea, în așteptarea unei orientări valabile privind toxicitatea acută, conform capitolului C.28 din prezenta anexă poate fi luat în considerare un test al toxicității cronice. Exemple de substanțe toxice de referință utilizate cu succes în teste interlaboratoare și studii de validare sunt: lindan, trifluralin, pentaclorfenol, clorura de cadmiu și clorură de potasiu. (1) (3) (6) (7) (18).

## VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- eclozarea medie în tratamentul de control trebuie să fie de cel puțin 70 % la sfârșitul perioadei de expunere pentru ambele generații (1) (7);
- pentru *C. riparius* și pentru *C. yoshimatsui* 85 % din totalul chironomidelor adulte eclozate din vasul de tratament de control pentru ambele generații trebuie să aibă loc într-un interval de 12 – 23 de zile de la introducerea în vase a larvelor din primul stadiu larvar; pentru *C. dilutus*, este acceptabilă o perioadă cuprinsă între 20 și 65 zile;
- Raportul mediu al sexelor exemplarelor adulte complet eclozate și vii (ca fracție de femelă sau mascul) în tratamentul de control pentru ambele generații trebuie să fie de cel puțin 0,4, dar nu mai mare de 0,6;
- pentru fiecare cușcă de reproducere numărul de șiraguri de ouă din vasele de control ale primei generații trebuie să fie de cel puțin 0,6 per femelă adăugată în cușca de reproducere;
- proporția de șiraguri de ouă fertile din fiecare cușcă de reproducere ale controalelor primei generații trebuie să fie de cel puțin 0,6;
- la sfârșitul perioadei de expunere pentru ambele generații, pH-ul și concentrația oxigenului dizolvat se măsoară în fiecare vas. Concentrația oxigenului trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (*air saturation value* – ASV <sup>(1)</sup>), iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9 în toate vasele de testare;
- temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1$  °C.

## DESCRIEREA METODEI

## Vasele de testare și cuștile de reproducere

11. Larvele sunt expuse în pahare de laborator de sticlă de 600 ml măsurând circa 8,5 cm în diametru (a se vedea appendicele 5). Se pot folosi și alte vase, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm<sup>2</sup> pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și

<sup>(1)</sup> La 20 °C la presiune atmosferică standard, valoarea ASV din apa dulce este egală cu 9,1 mg/l (60 % este egal cu 5,46 mg/l)

▼ **M6**

adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie de circa 1:4. Trebuie utilizate cuști de reproducere (minimum 30 cm în toate cele trei dimensiuni) prevăzute o plasă (dimensiunea ochiului de circa 1 mm) minimum la partea superioară și pe o parte a cuștii (a se vedea appendicele 5). În fiecare cușcă, se introduce un vas de cristalizare de 2 l, care conține apă și sediment de testare, pentru depunerea ouălor. De asemenea, pentru vasul de cristalizare, raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie de aproximativ 1:4. După ce șiragurile de ouă sunt colectate din vasul de cristalizare, ele sunt plasate într-o placă de microtitrare cu 12 godeuri (un șirag per godeu conținând cel puțin 2,5 ml apă din vasul de cristalizare adăugat), ulterior plăcile fiind acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Pot fi utilizate și alte vase adecvate pentru păstrarea șiragurilor de ouă. Cu excepția plăcilor de microtitrare, se recomandă ca toate vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, politetrafluoretină).

**Alegerea speciei**

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. Se mai poate utiliza și *C. yoshimatsui*. Este potrivită și specia *C. dilutus*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. Detalii privind metodele de cultură a *C. riparius* sunt prezentate în appendicele 2. De asemenea, sunt disponibile informații privind condițiile de cultură pentru *C. dilutus* (5) și pentru *C. yoshimatsui* (14). Identificarea speciei trebuie să fie confirmată înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură proprie.

**Sediment**

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment formulat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și nici alte organisme care ar putea concura cu larvele de chironomide sau pe care le-ar putea consuma. De asemenea, înaintea testării se recomandă ca sedimentele să fie condiționate timp de șapte zile în condiții de testare. Se recomandă (1) (20) (21) următorul sediment formulat, astfel cum este descris în (1):
  - a. 4 – 5 % (greutate uscată) turbă: cu pH cât mai apropiat de valoarea 5,5 – 6; este important să se utilizeze turbă sub formă de pudră (dimensiunea particulelor  $\leq 1$  mm) și doar aer uscat;
  - b. 20 % (greutate uscată) argilă caolinică (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);
  - c. 75 – 76 % (greutate uscată) nisip de cuarț (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % dintre particule între 50 și 200  $\mu\text{m}$ );
  - d. Se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30 – 50 %;
  - e. Se adaugă carbonat de calciu de calitate chimică pură ( $\text{CaCO}_3$ ), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la  $7 \pm 0,5$ ;
  - f. Conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % ( $\pm 0,5$  %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).
14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, argilă caolinică și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a confirma absența

**▼ M6**

contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organoclorurați, compuși organofosforici). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului formulat. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turbă sau sedimentul sunt suficient condiționate.

**Apă**

15. Orice apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluție acceptabile, astfel cum este prezentată în apendicele 2 și 4, este potrivită ca apă pentru testare. Orice apă adecvată, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apă de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l CaCO<sub>3</sub>. Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța chimică testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai mică (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediul Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Caracteristicile calității apei prezentate în apendicele 4 trebuie să fie măsurate cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

**Soluții stoc – Apă adiționată**

16. a. Concentrațiile de testare se calculează pe baza concentrațiilor din coloana de apă, adică apa care acoperă sedimentul. Soluțiile de testare în concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin dizolvarea substanței chimice testate în apa de testare. În unele cazuri poate fi necesară folosirea solvenților sau a agenților de dispersie pentru a realiza o soluție stoc cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, eterul monoetilic al etilen glicolului, eterul dimetilic al etilen glicolului, dimetilformamida și trietilen glicolul. Agenții de dispersie care pot fi utilizați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația agentului de solubilizare în mediul de testare final trebuie să fie minimă (i.e. ≤ 0,1 ml/l) și trebuie să fie aceeași pentru toate tratamentele. În cazul utilizării unui agent de solubilizare, acesta nu trebuie să aibă niciun efect semnificativ asupra supraviețuirii, astfel cum a fost demonstrat cu ajutorul unui control cu solvent în comparație cu un control negativ (apă). Totuși, se vor lua toate măsurile necesare pentru evitarea utilizării unor astfel de materiale.

**Soluții stoc – Sediment adiționat**

16. b. De obicei, sedimentele adiționate la o concentrație aleasă sunt preparate prin adăugarea unei soluții de substanță chimică testată direct în sediment. O soluție stoc de substanță testată dizolvată în apa deionizată este amestecată cu sedimentul formulat cu ajutorul unui tambur, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. Dacă este puțin solubil în apă, substanța chimică testată se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform). Această soluție este apoi amestecată cu 10 g de nisip de cuarț fin pentru fiecare vas de testare. Se așteaptă evaporarea solventului și trebuie eliminat în totalitate din nisip; apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței chimice testate se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. Este necesar să se țină cont de faptul că nisipul provenit din amestecul de substanță chimică testată și nisip trebuie să fie luat în

**▼ M6**

considerare atunci când se prepară sedimentul (adică sedimentul trebuie să fie astfel preparat cu mai puțin nisip). Trebuie să se asigure că substanța chimică testată adăugată la sediment este distribuită completă și uniform în sediment. Dacă este necesar, se pot analiza subșantioane pentru determinarea gradului de omogenitate.

**PROTOCOLUL TESTULUI**

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și la spațierea concentrațiilor de testare, la numărul de vase pentru fiecare concentrație și la numărul de larve per vas, la numărul de vase de cristalizare și de cuști de creștere. Protocolul pentru  $EC_x$ , NOEC și pentru un test limită sunt descrise mai jos.

**Protocolul pentru analiza prin regresie**

18. Concentrația pentru care se observă efecte ( $EC_x$ ) și intervalul de concentrații la care efectul substanței chimice testate este de interes trebuie să fie cuprinse în test, astfel încât parametrul studiat să nu fie extrapolat în afara limitelor datelor generate. Extrapolarea mult sub cea mai mică sau peste cea mai mare concentrație trebuie evitată. Pentru selectarea unui interval adecvat de concentrații de testare poate fi utilă realizarea unui test preliminar de determinare a intervalelor în conformitate cu metodele de testare C.27 sau C.28.
19. Pentru o metodă implicând  $EC_x$ , sunt necesare cel puțin cinci concentrații și opt replici pentru fiecare concentrație. Pentru fiecare concentrație trebuie utilizate două cuști de reproducere (A și B). Cele opt replici sunt împărțite în două grupe a câte patru replici pentru a deservi fiecare cușcă de reproducere. Această reunire a replicilor este necesară datorită numărului de chironomide necesare în cușcă în vederea unor evaluări corecte ale reproducerii. Cu toate acestea, cea de a 2-a generație numără din nou opt replici, inițiate din populațiile expuse în cuștile de reproducere. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de doză-răspuns are o pantă ușoară). Numărul de replici pentru fiecare tratament poate fi redus la șase (trei pentru fiecare cușcă de reproducere) în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. Creșterea numărului de replici sau reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare tinde să micșoreze intervalele de încredere în jurul  $EC_x$ .

**Protocolul pentru estimarea NOEC**

20. Pentru o metodă privind NOEC, trebuie utilizate cel puțin cinci concentrații de testare și cel puțin opt replici (4 pentru fiecare cușcă de reproducere, A și B), iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de replici trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de control la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $\alpha = 0,05$ ). Pentru rata de dezvoltare, fecunditate și fertilitate, este în general utilă o analiză a varianței (ANOVA), urmată de testul Dunnett sau testul Williams (22 – 25). În ceea ce privește raportul de eclozare și raportul sexelor, pot fi utile testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecție Bonferroni) sau testul Mantel-Haentzel.

**Test limită**

21. Un test limită [o concentrație de testare și control (controale)] poate fi efectuat în cazul în care nu există efecte observate în testul preliminar opțional de determinare a intervalelor până la concentrația maximă. Scopul testului limită este de a indica faptul că orice efecte toxice ale substanței chimice testate se constată la niveluri superioare concentrației-limită testate. Pentru apă, sunt recomandate concentrații de 100 mg/l, iar pentru sediment de 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin opt replici, atât pentru tratament, cât și pentru control. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru

## ▼ M6

detectarea unei diferențe de 20 % față de control la un nivel de semnificație statistică de 5 % ( $\alpha = 0,05$ ). Cu răspunsuri metrice (rată de dezvoltare), testul t este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, varianțe omogene). În cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite, se poate utiliza testul t pentru varianțe inegale sau un test neparametric, precum testul Wilcoxon-Mann-Whitney. Pentru raportul de eclozare este adecvat testul exact al lui Fisher.

## PROCEDURA

## Condiții de expunere

*Pregătirea sistemului apă-sediment (adiționarea apei)*

22. a. Sediment formulat (a se vedea punctele 13 – 14 și apendicele 3) este introdus în fiecare vas de testare și de cristalizare pentru a forma un strat de minimum 1,5 cm (pentru vasul de cristalizare acesta poate fi relativ mai subțire), dar de maximum 3 cm. Apa (a se vedea punctul 15) este introdusă astfel încât raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei să nu depășească 1:4. După pregătirea vaselor de testare, sistemul sediment-apă trebuie lăsat la aerare ușoară timp de aproximativ șapte zile înainte de introducerea larvelor în primul stadiu din prima și din cea de a 2-a generație (a se vedea punctul 14 și apendicele 3). Sistemul sediment-apă al vaselor de cristalizare nu este aerat pe durata testării, deoarece nu este necesară asigurarea supraviețuirii larvelor (înainte de eclozare și răgurile de ouă sunt deja colectate). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și resuspendarea materiilor fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa. Discul este înlăturat imediat după aceea. Se pot utiliza și alte dispozitive.

*Pregătirea sistemului apă-sediment (sediment adiționat)*

22. b. Sedimentele adiționate pregătite conform punctului 16b sunt introduse în vase și în vasul de cristalizare, iar apa acoperitoare este adăugată pentru a se obține un raport volumic sediment-apă de 1:4. Adâncimea stratului de sediment trebuie să fie cuprinsă între 1,5 și 3 cm (aceasta poate fi relativ mai mică pentru vasul de cristalizare). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și resuspendarea materiilor fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive. După adăugarea de apă acoperitoare peste sedimentul adiționat, este de dorit să se lase timp pentru migrarea substanței chimice testate din sediment în faza apoasă (4) (5) (7) (18). De preferință, aceasta trebuie să se realizeze în condițiile de temperatură și aerare utilizate în test. Perioada de timp corespunzătoare pentru echilibrare depinde de sediment și de substanța chimică și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge până la cinci săptămâni. Întrucât în această perioadă s-ar putea produce degradarea multor substanțe chimice, nu se așteaptă atingerea echilibrului, dar se recomandă o perioadă de echilibrare de 48 de ore. Cu toate acestea, atunci când timpul de înjumătățire a degradării substanței chimice în sediment este cunoscut ca fiind lung (a se vedea punctul 8), perioada de echilibrare poate fi prelungită. La sfârșitul acestei perioade de echilibrare suplimentare, concentrația substanței chimice testate trebuie să fie măsurată în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, cel puțin la concentrația cea mai mare și la una mai mică (a se vedea punctul 38). Aceste determinări analitice ale substanței chimice testate permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor măsurate.
23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). Dacă este necesar, în timpul studiului nivelul apei se completează până la volumul original, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să se efectueze cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri. Vasele de cristalizare din cuștile de reproducere nu sunt acoperite și este posibil, însă nu indispensabil, să fie



▼ **M6**

ajustate pentru a compensa pierderea de apă pe durata perioadei de testare, întrucât șiragurile de ouă sunt în contact cu apa numai timp de aproximativ o zi, iar vasele sunt utilizate numai într-o scurtă fază a testului.

*Adăugarea de organisme de testare*

24. Cu patru sau cinci zile înainte de a introduce larve în primul stadiu pentru prima generație, masele de ouă trebuie prelevate din cultură și plasate în vase mici conținând mediul de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură învechit provenit din cultura stoc sau un mediu proaspăt preparat. În orice caz, în mediul de cultură se va adăuga o mică cantitate de hrană, de exemplu câteva picături dintr-o suspensie de hrană fin măcinată pentru pești sub formă de fulgi (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar mase de ouă proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze după aproximativ 2 zile de la depunerea ouălor (2 – 3 zile pentru *C. riparius* la 20 °C și 1 – 4 zile pentru *C. dilutus* la 23 °C și *C. yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvelor se realizează în patru stadii, fiecare cu o durată de 4 – 8 zile. În test trebuie utilizate larve în primul stadiu (maximum 48 de ore după eclozare). Este posibilă verificarea stadiului de dezvoltare a larvelor în funcție de lățimea capsulei cefalice (7).
25. Douăzeci de larve din primul stadiu de dezvoltare pentru prima generație sunt alocate în mod aleatoriu fiecărui vas de testare care conține sistemul de sediment-apă, cu ajutorul unei pipete neefilate. Aerarea apei este oprită în timpul introducerii larvelor în vasele de testare și trebuie să rămână astfel timp de 24 de ore după introducerea acestora (a se vedea punctul 32). În funcție de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve folosite pentru fiecare concentrație este de cel puțin 120 (6 replici per concentrație) pentru metoda EC<sub>x</sub> și de cel puțin 160 pentru metoda NOEC (8 replici per concentrație). În cazul protocolului cu sediment adiționat, expunerea începe o dată cu introducerea larvelor.

*Adiționarea apei acoperitoare*

26. La douăzeci și patru de ore după adăugarea de larve în primul stadiu larvar pentru prima generație, substanța chimică testată este adiționată în coloana de apă acoperitoare, fiind asigurată din nou o ușoară aerare (pentru posibile modificări ale protocolului de testare, a se vedea punctul 7). Cu ajutorul unei pipete se aplică mici volume de soluții stoc de substanță chimică testată sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. În cadrul protocolului cu apă adiționată, expunerea începe cu adiționarea apei (la o zi de la introducerea larvelor).

*Colectarea adulților eclozați*

27. Chironomidele eclozate din prima generație sunt colectate cel puțin o dată, însă, de preferință, de două ori pe zi (a se vedea punctul 36) din vasele de testare cu ajutorul unui aspirator, exhaustor sau al unui dispozitiv similar (a se vedea apendicele 5). Trebuie să fie acordată o atenție deosebită pentru a nu provoca leziuni adulților. Chironomidele colectate din patru vase de testare aferente unui tratament sunt eliberate într-o cușcă de reproducere la care au fost repartizate în prealabil. În ziua primei eclozări (masculi), vasele de cristalizare sunt adiționate prin introducerea cu ajutorul unei pipete a unui volum mic de soluție stoc de substanță chimică testată sub suprafața apei (protocol cu apă adiționată). Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. Concentrația substanței chimice testate din vasul de cristalizare este în mod nominal aceeași ca în vasele de tratament care sunt alocate respectivei cuști de reproducere specifice. În cadrul protocolului cu sediment adiționat, vasele de cristalizare sunt preparate în aproximativ,



## ▼ M6

ziua a 11-a de la începerea expunerii (introducerea de larve de primă generație), astfel încât să se poată realiza echilibrarea acestora timp de aproximativ 48 de ore înainte de producerea primelor șiraguri de ouă.

28. Șiragurile de ouă sunt colectate din vasul de cristalizare în cușca de reproducere cu ajutorul unor pensete sau al unei pipete neefilate. Fiecare șirag de ouă se introduce într-un vas care conține mediu de cultură din vasul de cristalizare din care a fost colectat (de exemplu, o microplacă cu 12 godeuri împreună cu cel puțin 2,5 ml de mediu). Vasele care conțin șiragurile de ouă sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Șiragurile de ouă sunt păstrate pentru observație timp de cel puțin șase zile după ce au fost produse, astfel încât să poată fi clasificate ca fertile sau infertile.

Pentru începerea celei de a 2-a generații, cel puțin trei, însă de preferință șase șiraguri de ouă fertile sunt selectate din fiecare cușcă de creștere și, cu puțină hrană, sunt lăsate să eclozeze. Aceste șiraguri de ouă trebuie să fi fost produse în momentul maxim al activității de depunere a ouălor, care în mod normal are loc în jurul celei de a 19-a zile de testare în controale. În mod ideal, a 2-a generație în toate grupurile de tratament apare în aceeași zi, însă din cauza efectelor substanței chimice asupra dezvoltării larvelor, se poate ca aceasta să nu fie posibilă întotdeauna. În acest caz, concentrațiile mai mari pot fi inițiate mai târziu decât tratamentele cu concentrații mai mici și controlul (solvent).

29. a. În cadrul protocolului cu apă adădită, sistemul apă-sediment pentru cea de a 2-a generație este pregătit prin adăugarea substanței chimice testate în coloana de apă acoperitoare cu circa 1 oră înainte de introducerea larvelor în primul stadiu de dezvoltare în vasele de testare. Cu ajutorul unei pipete, se aplică mici volume de soluții stoc ale substanțelor chimice testate sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. După adăugare, se asigură o ușoară aerare.
29. b. În protocolul cu sediment adăugat, vasele de expunere care conțin sistemul apă-sediment pentru cea de a 2-a generație sunt pregătite în același mod ca pentru prima generație.
30. Douăzeci de larve în primul stadiu de dezvoltare (maximum 48 de ori după eclozare) din cea de a 2-a generație sunt alocate în mod aleatoriu fiecărui vas de testare care conține sistemul sediment adăugat-apă, cu ajutorul unei pipete neefilate. Aerarea apei trebuie să fie oprită după introducerea de larve din primul stadiu de dezvoltare în vasele de testare și trebuie să fie menținută astfel timp de încă 24 de ore după introducerea larvelor. În funcție de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve folosite pentru fiecare concentrație este de cel puțin 120 (6 replici per concentrație) pentru metoda EC<sub>x</sub> și de cel puțin 160 pentru metoda NOEC (8 replici per concentrație).

#### Hrană

31. Larvele din vasele de testare trebuie să fie hrănite de preferință zilnic sau de cel puțin trei ori pe săptămână. Hrană pentru pești (o suspensie în apă sau hrană fin măcinată, de exemplu Tetra-Min sau Tetra-Phyll; a se vedea detalii în apendicele 2) între 0,25 și 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) per larvă per zi reprezintă o cantitate adecvată de hrană pentru larvele tinere în primele 10 zile a dezvoltării lor. Este posibil să fie necesară mai multă hrană pentru larvele cu vârstă mai mare: 0,5 – 1 mg per larvă per zi ar trebui să fie suficient pentru restul testului. Porția de hrană trebuie să fie redusă pentru toate grupurile tratate sau de control dacă se constată dezvoltarea de ciuperci sau dacă sunt observate cazuri de deces la controale. În cazul în care dezvoltarea de ciuperci nu poate fi oprită, testul trebuie repetat.

Relevanța toxicologică a expunerii prin ingestie este în general mai mare în cazul substanțelor chimice cu o puternică afinitate pentru carbonul

## ▼ M6

organic sau al substanțelor chimice cu legături covalente cu sedimentul. Prin urmare, în cazul testării substanțelor chimice care au astfel de proprietăți, cantitatea de hrană necesară pentru a asigura supraviețuirea și creșterea naturală a larvelor poate fi adăugată în sedimentul formulat înainte de perioada de stabilizare, în funcție de cerința de reglementare. Pentru a preveni deteriorarea calității apei, trebuie folosite plante în loc de hrană pentru pești, de exemplu adăugarea a 0,5 % (greutate uscată) de frunze fin măcinate de urzică (*Urtica dioica*), de dade (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de la alte plante (*Cerophyl* sau  $\alpha$ -celuloză). Adăugarea în sediment a întregii porții de hrană de origine organică înainte de adăugare nu este lipsită de consecințe în ceea ce privește calitatea apei și performanțele biologice (21) și nici nu reprezintă o metodă standardizată, însă studii recente indică că această metodă dă rezultate (19) (26). Chironomidele adulte din cuștile de reproducere nu au în mod normal nevoie de hrană, însă fecunditatea și fertilitatea sunt îmbunătățite atunci când adulților eclozați li se pune la dispoziție ca sursă de hrană un tampon de vată îmbibat cu o soluție saturată de zaharoză (34).

*Condiții de incubare*

32. Aerarea ușoară a apei acoperitoare în vasele de testare se efectuează cu 24 de ore după adăugarea larvelor din primul stadiu de dezvoltare din ambele generații și este continuată pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenție concentrației de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din ASV). Aerarea se face cu ajutorul unei pipete Pasteur din sticlă a cărei orificiu este fixat la 2 – 3 cm deasupra stratului de sediment eliberând câteva bule pe secundă. La testarea substanțelor chimice volatile, trebuie să se acorde atenție ca sistemul sediment-apă să nu fie aerat, asigurând în același timp respectarea criteriului de validitate de 60 % din ASV (punctul 10). Orientări suplimentare sunt disponibile la referința (16).
33. Testul pentru *C. riparius* se efectuează la o temperatură constantă de 20 °C ( $\pm 2$  °C). Pentru *C. dilutus* și *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C și, respectiv, 25 °C ( $\pm 2$  °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar intensitatea luminii trebuie să fie de 500 – 1 000 lux. Pentru cuștile de reproducere, poate fi inclusă o oră suplimentară de fază de zori și de amurg.

*Durata expunerii*

34. Protocolul cu apă adăugată: Perioada de expunere a primei generații începe atunci când substanța chimică testată este adăugată în apa acoperitoare a vaselor de testare (adică la o zi de la introducerea larvelor – pentru modificări posibile ale protocolului de expunere, a se vedea punctul 7). Expunerea larvelor din cea de a 2-a generație începe imediat, întrucât ele sunt introduse într-un sistem sediment-apă deja adăugat. Durata maximă de expunere pentru 1-a generație este de 27 de zile, iar pentru a 2-a generație este de 28 de zile (larvele din 1-a generație petrec o zi în vasele fără expunere) pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui*. Ținând cont de suprapunere, durata totală a testării este de aproximativ 44 de zile. Pentru *C. dilutus*, duratele maxime de expunere sunt de 64 și de 65 de zile pentru prima generație și, respectiv, pentru cea de a 2-a generație. Durata totală este de aproximativ 100 de zile.

Protocolul cu sediment adăugat: expunerea începe cu adăugarea de larve și este de maximum 28 de zile pentru ambele generații pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de maximum 65 de zile pentru ambele generații pentru *C. dilutus*.

**Observații***Eclozare*

35. Timpul de dezvoltare și numărul total de chironomide, femele și masculi, eclozate și vii sunt determinate pentru ambele generații. Masculii sunt ușor de identificat prin antenele plumoase și prin corpul lor fin.

## ▼ M6

36. Vasele de testare pentru ambelor generații trebuie observate de cel puțin trei ori pe săptămână pentru a vedea dacă larvele prezintă comportamente anormale (de exemplu, ieșirea din sediment, înot neobișnuit) în raport cu controlul. În perioada de eclozare, care începe după aproximativ 12 zile de la introducerea larvelor pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* (după 20 de zile pentru *C. dilutus*), chironomidele eclozate sunt numărate și li se stabilește sexul cel puțin o dată, dar, de preferință, de două ori pe zi (dimineața devreme și după-amiaza târziu). După identificare, chironomidele din prima generație sunt îndepărtate cu grijă din vase și sunt transferate într-o cușcă de reproducere. Chironomidele din cea de a 2-a generație sunt îndepărtate și ucise după identificare. Orice șiraguri de ouă depozitate în vasele de testare ale primei generații trebuie să fie colectate individual și transferate cu cel puțin 2,5 ml de apă nativă în plăci de microtitrare cu 12 godeuri (sau în alte vase adecvate) care sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Numărul de larve moarte și pupe vizibile care nu au eclozat trebuie înregistrate. Exemple de cuști de reproducere, de vase de testare și de exhaustoare sunt furnizate în apendicele 5.

*Reproducerea*

37. Efectele asupra reproducerii sunt evaluate prin determinarea numărului de șiraguri de ouă produse de prima generație de chironomide și prin fertilitatea acestor șiraguri de ouă. O dată pe zi șiragurile de ouă sunt colectate din vasele de cristalizare plasate în fiecare recipient de reproducere. Șiragurile de ouă trebuie colectate și transferate cu cel puțin 2,5 ml de apă nativă într-un placă de microtitrare cu 12 godeuri (un șirag de ouă în fiecare godeu) sau în alte vase adecvate care sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Următoarele caracteristici sunt documentate pentru fiecare șirag de ouă: ziua de producție, dimensiuni (normale, adică  $1 \pm 0,3$  cm sau mici; tipic  $\leq 0,5$  cm) și structura (normală = formă de banană cu șirag de ouă dispuse în spirală sau anormală, de exemplu, șirag de ouă nespălat) și fertilitatea (fertile sau infertile). Pe parcursul unei perioade de șase zile după producere fertilitatea unui șirag de ouă este evaluată. Un șirag de ouă este considerat fertil atunci când cel puțin un ou din trei eclozează. Numărul total de femele introduse în cușca de reproducere este utilizat pentru a calcula numărul de șiraguri de ouă per femelă și numărul de șiraguri de ouă fertile per femelă. Dacă este necesar, numărul de ouă dintr-un șirag de ouă poate fi estimat în mod nedistructiv cu ajutorul metodei numărării inelelor (detaliată în referințele 32 și 33).

**Măsurători analitice***Concentrația substanței chimice testate*

38. Ca cerință minimă, eșantioanele din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment trebuie analizate la începutul expunerii (în cazul adăugării apei, de preferință la o oră după aplicare) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai mică. Aceasta se aplică vaselor din ambele generații. Din vasele de cristalizare în cuștile de reproducere numai apa acoperitoare este analizată, întrucât doar cu aceasta intră în contact șiragurile de ouă (în ceea ce privește protocolul cu sediment adăugat, poate fi avută în vedere o confirmare analitică a concentrației sedimentului). Dacă se consideră necesar, pe durata testului pot fi efectuate măsurători suplimentare ale sedimentului, ale apei interstițiale sau ale apei acoperitoare. Aceste determinări ale concentrației substanței chimice testate furnizează informații despre comportamentul/partiția substanței chimice testate în sistemul apă-sediment. Eșantionarea sedimentului și a apei interstițiale la începutul și pe durata testului (a se vedea punctul 39) necesită vase de testare suplimentare pentru realizarea de determinări analitice. Măsurătorile efectuate în sediment în cadrul protocolului cu apă adăugată pot să nu fie necesare dacă migrarea

▼ **M6**

substanței chimice testate între apă și sediment a fost determinată în mod clar într-un studiu apă/sediment în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment/apă, tipul de aplicare, conținutul de carbon organic din sediment) sau dacă se arată că concentrațiile măsurate în apa acoperitoare au rămas la valori cuprinse între 80 și 120 % din valorile nominale sau măsurate inițial.

39. Atunci când se efectuează măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a 7-a și/sau a 14-a) și dacă pentru analiză este nevoie de eșantioane mari care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe eșantioane din vase de testare suplimentare tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.
40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța chimică testată nu se adsorbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

*Parametri fizico-chimici*

41. pH-ul, oxigenul dizolvat în apa de testare și temperatura apei din vasele de testare și din vasele de cristalizare trebuie măsurate în mod corespunzător (a se vedea punctul 10). Duritatea apei și amoniacul trebuie măsurate în vasele de control, precum și în unul dintre vasele de testare și de cristalizare la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

**DATE ȘI RAPORTARE****Tratamentul rezultatelor**

42. Scopul acestui test care cuprinde ciclul de viață este determinarea efectului substanței chimice testate asupra reproducerii și, pentru două generații, a ratei de dezvoltare și a numărului total al chironomidelor complet eclozate și vii, femele și masculi. Pentru a determina rata de eclozare, trebuie agregate datele privind femelele și masculii. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între sensibilitățile ratelor de dezvoltare ale sexelor separate, rezultatele privind femelele și masculii pot fi agregate pentru analizare statistică.
43. Concentrațiile la care se observă efecte exprimate sub formă de concentrații în apa acoperitoare (pentru apa adăugată) sau în sediment (pentru sedimentul adăugat) sunt calculate de obicei pe baza concentrațiilor măsurate la începutul expunerii (a se vedea punctul 38). Prin urmare, pentru apa adăugată, concentrațiile măsurate în mod tipic la începutul expunerii în apa acoperitoare a vaselor pentru ambele generații și cele măsurate în vasele de cristalizare sunt transformate în medii pentru fiecare tratament. Pentru sedimentul adăugat, concentrațiile măsurate în mod tipic la începutul expunerii în vasele pentru ambele generații (și opțional cele măsurate în vasele de cristalizare) sunt transformate în medii pentru fiecare tratament.
44. Pentru a calcula o estimare punctuală, adică o  $EC_x$ , datele statistice per vas și per cușcă de reproducere pot fi utilizate ca replici veritabile. La calcularea intervalului de încredere pentru orice  $EC_x$ , trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de mică încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la datele statistice pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității varianței. Totuși, valorile  $EC_x$  trebuie să fie calculate după ce răspunsul este transformat înapoi la valoarea originală (31).

## ▼ M6

45. Atunci când analiza statistică vizează determinarea NOEC prin testarea ipotezei, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, ceea ce garantează utilizarea metodelor ANOVA (de exemplu, procedurile de testare Williams și Dunnett). Testul Williams este adecvat atunci când o relație doză-răspuns monotonă este preconizată în teorie, iar testul Dunnett este adecvat atunci când ipoteza monotonicității nu este preconizată. Alternativ, teste mai robuste (27) pot fi adecvate în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite (31).

*Rata de eclozare*

46. Ratele de eclozare sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se preconizează o relație doză-răspuns monotonă și când aceste date corespund preconizării. În caz contrar, se poate utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haentzel, cu valori  $p$  ajustate Bonferroni-Holm. În cazul în care există dovezi că variabilitatea între replici este mai mare la aceeași concentrație decât ar indica o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în referința (27).

Suma chironomidelor vii (masculi plus femele) eclozate per vas,  $n_e$ , este determinată și împărțită la numărul de larve introduse,  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

unde:

$ER$  = rata de eclozare

$n_e$  = numărul de chironomide vii eclozate per vas

$n_a$  = numărul de larve introduse per vas (în mod normal 20)

Atunci când  $n_e$  este mai mare decât  $n_a$  (adică atunci când a fost introdus în mod neintenționat un număr de larve mai mare decât numărul prevăzut)  $n_a$  trebuie să fie adus la egalitate cu  $n_e$ .

47. O abordare alternativă mai adecvată pentru eșantioane de dimensiuni mari, atunci când există o varianță extra-binomială, este tratarea ratei de eclozare ca răspuns continuu și utilizarea de proceduri coerente cu aceste date  $ER$ . O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind numărul de eclozări și numărul de neeclozări, ambele mai mari decât cinci, per replică (vas).
48. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile  $ER$  trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea  $\arcsin\text{-}\sqrt{\phantom{x}}$  sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza varianțele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haentzel pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea  $\arcsin\text{-}\sqrt{\phantom{x}}$  este aplicată prin preluarea inversul sinusului ( $\sin^{-1}$ ) al rădăcinii pătrate a  $ER$ .
49. Pentru ratele de eclozare, valorile  $EC_x$  sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [de exemplu, *probit*, *logit* sau modelele Weibull (28)]. În cazul în care analiza de regresie eșuează (de exemplu, atunci când există mai puțin de două răspunsuri parțiale), se utilizează alte metode neparametrice, precum media mobilă sau interpolarea simplă.
- Rata de dezvoltare*
50. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și eclozarea cohortelor experimentale de chironomide (pentru calcularea duratei de dezvoltare reale,

▼ **M6**

trebuie luată în considerare vârsta larvelor în momentul introducerii). Rata de dezvoltare (unitate: 1/zi) este inversul duratei de dezvoltare și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate cu sedimente, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, cu rata de dezvoltare se pot utiliza proceduri de testare parametrică mai puternice, spre deosebire de durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca răspuns continuu, valorile  $EC_x$  pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu, (29), (30)]. O NOEC pentru rata de dezvoltare medie poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett. Întrucât eclozarea masculilor are loc mai devreme decât cea a femelelor, adică au o rată de dezvoltare mai ridicată, are sens ca rata de dezvoltare să fie calculată separat pentru fiecare sex, în plus față de cea pentru toate chironomidele.

51. Pentru testele statistice, se presupune că numărul de chironomide observate în ziua de inspecție  $x$  au eclozat la media intervalului de timp dintre ziua  $x - 1$  ( $l$  = lungimea intervalului de inspecție, de obicei 1 zi). Rata medie de dezvoltare per vas ( $\bar{x}$ ) este calculată cu formula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

unde:

$\bar{x}$ : rata medie de dezvoltare per vas

$i$ : indicele intervalului de inspecție

$m$ : numărul maxim de intervale de inspecție

$f_i$ : numărul de chironomide eclozate în intervalul de inspecție  $i$

$n_e$ : numărul total de chironomide eclozate la sfârșitul experimentului ( $\sum f_i$ )

$x_i$ : rata de dezvoltare a chironomidelor eclozate în intervalul  $i$

$$x_i = 1 / \text{ziua}_i - \frac{l_i}{2}$$

unde:

$\text{ziua}_i$ : ziua de inspecție (numărul de zile de la introducerea larvelor)

$l_i$ : lungimea intervalului de inspecție  $i$  (zile, de obicei 1 zi)

#### Raportul sexelor

52. Datele privind raportul sexelor sunt date cantitative și, prin urmare, trebuie evaluate cu ajutorul testului exact al lui Fisher sau al altor metode adecvate. Raportul natural al sexelor pentru *C. riparius* este unu, adică masculii și femelele sunt în număr egal. Pentru ambele generații, datele privind raportul sexelor trebuie tratate în mod identic. Întrucât numărul maxim de chironomide per vas (20) este prea mic pentru o analiză statistică semnificativă, se va aduna numărul total de chironomide

**▼ M6**

complet eclozate și vii pentru fiecare sex din toate vasele corespunzătoare unui singur tratament. Aceste date brute sunt comparate cu controlul (solvent) sau cu datele agregate referitoare la control într-un tabel de contingență  $2 \times 2$ .

*Reproducerea*

53. Reproducerea, la fel ca fecunditatea, se calculează ca numărul de șiraguri de ouă per femelă. Mai specific, numărul total de șiraguri de ouă produs într-o cușcă de reproducere este împărțit la numărul total de femele vii și fără leziuni introduse în cușca respectivă. NOEC pentru fecunditate poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett.
54. Fertilitatea șiragurilor de ouă este utilizată pentru cuantificarea numărului de șiraguri de ouă fertile per femelă. Numărul total de șiraguri de ouă fertile produs într-o cușcă de reproducere este împărțit la numărul total de femele vii și fără leziuni, introduse în cușca respectivă. NOEC pentru fertilitate poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett.

**Raportul privind testul**

55. Raportul privind testul trebuie să furnizeze următoarele informații:

*Substanța chimică testată:*

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, coeficientul de partiție  $\log K_{ow}$  în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];
- datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței chimice testate.

*Speciile folosite pentru testare:*

- organisme de testare utilizate: specie, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de creștere;
- informații privind modul în care au fost manipulate masele de ouă și larvele;
- informații privind manipularea adulților eclozați din prima generație cu ajutorul unui exhaustor (a se vedea apendicele 5);
- vârsta organismelor de testare în momentul introducerii lor în vasele de testare pentru prima și cea de a 2-a generație.

*Condiții de testare:*

- sedimentul folosit, adică sediment natural sau formulat (artificial);
- sediment natural: locația de prelevare și descrierea ei, incluzând, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristicile sedimentului: pH, conținutul de carbon organic, raportul C/N și granulometria (dacă este cazul).
- sediment formulat: pregătirea, ingredientele și caracteristicile (conținutul de carbon organic, pH-ul, umiditatea etc. măsurate la începutul testului);
- pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, duritate etc. măsurate la începutul testului);

**▼ M6**

- adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;
- volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului umed cu și fără apă interstițială pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;
- vasele de testare (material și dimensiune);
- vasele de cristalizare (material și dimensiune);
- cuști de reproducere (material și dimensiune);
- metoda de preparare a soluțiilor stoc și a concentrațiilor de testare pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;
- aplicarea substanței chimice testate în vasele de testare și în vasele de cristalizare: concentrațiile de testare, numărul de replici și solvenții, dacă este necesar;
- condițiile de incubare pentru vasele de testare: temperatură, ciclul și intensitatea luminii, aerare (numărul de bule pe secundă);
- condițiile de incubare pentru cuștile de reproducere și pentru vasele de cristalizare: temperatură, ciclul și intensitatea luminii;
- condițiile de incubare pentru șiragurile de ouă din microplăci (sau din alte vase): temperatură, ciclul și intensitatea luminii;
- informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

*Rezultate:*

- valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice testate în vasele de testare și în vasele de cristalizare;
- calitatea apei din vasele de testare și din vasele de cristalizare, și anume, pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și amoniacul;
- înlocuirea apei de testare evaporate pentru vasele de testare, dacă este cazul;
- numărul de chironomide, masculi și femele, eclozate per vas și pe zi pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;
- raportul sexelor chironomidelor complet eclozate și vii per tratament pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;
- numărul larvelor neeclozate ca chironomide per vas pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;
- procentul/fracție de eclozare per replică și concentrația de testare (chironomide masculi și femele agregate) pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;
- rata de dezvoltare medie a chironomidelor complet eclozate și vii per replică și rata de tratament (chironomide masculi și femele separate și agregate) pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;
- numărul de șiraguri de ouă depozitate în vasele de cristalizare per cușcă de reproducere și per zi;



▼ **M6**

- caracteristicile fiecărui șirag de ouă (dimensiune, formă și fertilitate);
- fecunditatea – numărul total de șiraguri de ouă per număr total de femele introduse în cușca de reproducere;
- fertilitatea – numărul total de șiraguri de ouă per număr total de femele introduse în cușca de reproducere;
- estimate ale parametrilor studiați care semnifică toxicitate, de exemplu  $EC_x$  (și intervalele de încredere asociate), NOEC și metodele statistice utilizate pentru determinarea lor;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra semnificației testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Chapter C.28 of this Annex, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311-322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.

▼ **M6**

- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Chapter C.27 of this Annex, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.
- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MO-NO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) 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.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.

**▼ M6**

- (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

**▼ M6***Apendicele 1***Definiții**

În cadrul acestei metode de testare se folosesc următoarele definiții:

**Substanța chimică** este o substanță sau un amestec.

**Sedimentul formulat** sau reconstituit, artificial sau sintetic, este un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

**Apa acoperitoare** este apa plasată peste sediment în vasul de testare.

**Apa interstițială** este apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

**Apa adăugată** este apa de testare la care s-a adăugat substanța chimică testată.

**Substanța chimică testată** este orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼ **M6***Apendicele 2***Recomandări pentru cultivarea *Chironomus riparius***

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip fin de cuarț într-un strat subțire, de circa 5 – 10 mm grosime. Un substrat adecvat (este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm) s-a dovedit a fi și Kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Apoi se adaugă apă adecvată până se atinge o înălțime de câțiva cm. Nivelurile apei trebuie să fie completate în funcție de necesități pentru a înlocui apa evaporată și a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cușcă adecvată, pentru a nu permite ca adulții eclozați să scape. Cușca trebuie să fie suficient de mare pentru a permite formarea roiurilor de adulți eclozați, altfel este posibil să nu apară copulația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).
2. Cuștile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la 20 ± 2 °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (intensitate de circa 1 000 lux), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

**Apa de diluție**

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă eprubetele cu larve.

**Hrănirea larvelor**

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă similară de hrană pentru pești), în cantitate de aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi furnizată sub formă de pulbere măcinată uscată sau sub formă de suspensie în apă: se adaugă 1 g de hrană sub formă de fulgi în 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat cu o rată de aproximativ 5 ml pe zi per vas. (se agită înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai avansată pot primi mai mult.
5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „tulbure”, hrănirea trebuie redusă. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină mâncare va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.
6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

**Hrănirea adulților eclozați**

7. Unii cercetători au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții eclozați un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.

▼ **M6****Eclozare**

8. La  $20 \pm 2$  °C, adulții vor începe să eclozeze în vasele de creștere a larvelor după aproximativ 13 – 15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase și după corpul lor fin.

**Masele de ouă**

9. După ce adulții sunt prezenți în cușca de reproducere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de mase de ouă gelatinoase. Dacă acestea apar, masele de ouă trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține un eșantion din apa în care au crescut. Masele de ouă sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2 – 4 mase de ouă /vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.
10. Larvele în primul stadiu trebuie să eclozeze după 2 – 3 zile.

**Pregătirea de noi vase de cultură**

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce chironomidele adulte au eclozat. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de efort.

**Pregătirea soluțiilor de testare „M4” și „M7”**

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este pregătit în același mod ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1 pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai mici în cazul „M7” în raport cu „M4”. Soluția de testare nu trebuie pregătită conform indicațiilor Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  și  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  indicate pentru pregătirea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

**Pregătirea mediului „M7”**

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). 50 de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 sunt adăugate până la 1 litru cu apă deionizată pentru a pregăti mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote. Mediul este aerat și stabilizat.

Tabelul 1

**Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7**

| Soluții stoc (I)                              | Cantitate (mg) adăugată la 1 litru de apă deionizată | Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă până la 1 litru cu apă deionizată |      | Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l) |       |
|---|--|---|------|--|-------|
|   |  | M4  | M7   | M4   | M7    |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)                   | 57 190   | 1   | 0,25 | 2,86   | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1) | 7 210  | 1   | 0,25 | 0,361  | 0,09  |
| $\text{LiCl}$ (1)                             | 6 120  | 1   | 0,25 | 0,306  | 0,077 |

▼ **M6**

| Soluții stoc (I)   | Cantitate (mg) adăugată la 1 litru de apă deionizată | Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă până la 1 litru cu apă deionizată |      | Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l) |         |
|--|--|---|------|--|---------|
|  |  | M4  | M7   | M4   | M7      |
| RbCl <sup>(1)</sup>  | 1 420  | 1   | 0,25 | 0,071  | 0,018   |
| SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 3 040  | 1   | 0,25 | 0,152  | 0,038   |
| NaBr <sup>(1)</sup>  | 320  | 1   | 0,25 | 0,016  | 0,004   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>    | 1 260  | 1   | 0,25 | 0,063  | 0,016   |
| CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>                   | 335  | 1   | 0,25 | 0,017  | 0,004   |
| ZnCl <sub>2</sub>  | 260  | 1   | 1    | 0,013  | 0,013   |
| CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                                  | 200  | 1   | 1    | 0,010  | 0,010   |
| KI   | 65   | 1   | 1    | 0,0033   | 0,0033  |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                                       | 43,8   | 1   | 1    | 0,0022   | 0,0022  |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>  | 11,5   | 1   | 1    | 0,00058  | 0,00058 |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> | 5 000  | 20,0  | 5    | 2,5  | 0,625   |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>    | 1 991  | 20,0  | 5    | 1  | 0,249   |

<sup>(1)</sup> Aceste substanțe diferă în M4 și M7, astfel cum s-a indicat mai sus.

<sup>(2)</sup> Aceste soluții sunt pregătite individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavate imediat.

Tabelul 2

**Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7**

|  | Cantitate adăugată până la 1 litru cu apă deionizată (mg) | Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru pregătirea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|--|---|---|---|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 293 800   | 1   | 293,8   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O  | 246 600   | 0,5   | 123,3   |
| KCl                                    | 58 000  | 0,1   | 5,8   |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | 64 800  | 1   | 64,8  |
| NaSiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O | 50 000  | 0,2   | 10  |
| NaNO <sub>3</sub>                      | 2 740   | 0,1   | 0,274   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1 430   | 0,1   | 0,143   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 1 840   | 0,1   | 0,184   |

▼ **M6**

Tabelul 3

**Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7**

Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a se obține o singură soluție stoc de vitamine.

|                       | Cantitate adăugată până la 1 litru cu apă deionizată (mg) | Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l) | Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l) |
|-----------------------|---|---|---|
| Clorhidrat de tiamină | 750   | 0,1   | 0,075   |
| Cianocobalamină (B12) | 10  | 0,1   | 0,001   |
| Biotină               | 7,5   | 0,1   | 0,00075   |

## REFERINȚE

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Strelke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.



▼ **M6***Apendicele 3***Prepararea sedimentului formulat****COMPOZIȚIA SEDIMENTULUI**

Compoziția sedimentului formulat trebuie să fie următoarea:

| Constituent        | Caracteristici   | % din sediment, greutate uscată |
|--------------------|--|---------------------------------|
| Turbă              | Mușchi de turbă ( <i>Sphagnum</i> ), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5 – 6, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor $\leq 1$ mm) și uscat cu aer | 4 – 5                           |
| Nisip de cuarț     | Dimensiunea granulelor: $> 50$ % dintre particule trebuie să se încadreze în intervalul 50 – 200 $\mu\text{m}$   | 75 – 76                         |
| Argilă de caolinit | Conținut de caolinit $\geq 30$ %   | 20                              |
| Carbon organic     | Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip   | 2 ( $\pm 0,5$ )                 |
| Carbonat de calciu | $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, chimic pur   | 0,05 – 0,1                      |
| Apă                | Conductivitate $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$  | 30 – 50                         |

**PREGĂTIRE**

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. O suspensie din cantitatea necesară de pudră de turbă în apă deionizată este preparată utilizând un dispozitiv de omogenizare performant. pH-ul acestei suspensii este ajustat la  $5,5 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ . Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la  $20 \pm 2$  °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie de  $6 \pm 0,5$ . Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolinică) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în intervalul de 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Se prelevează eșantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea sa într-un test de toxicitate pentru chironomide, se recomandă ca sedimentul formulat să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

**DEPOZITARE**

Constituenții uscați destinați preparării sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul formulat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în test. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea sa.

**REFERINȚE**

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

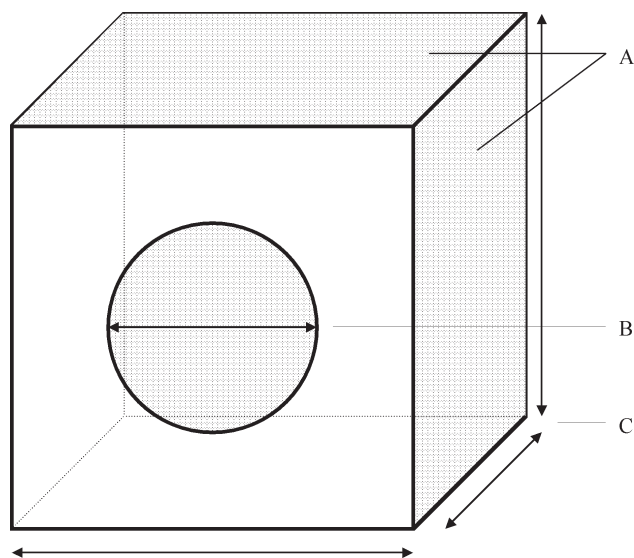
▼ **M6***Apendicele 4***Caracteristicile chimice ale unei ape de diluție acceptabile**

| CONSTITUENT   | CONCENTRAȚII   |
|---|----------------|
| Materie particulată   | < 20 mg/l      |
| Carbon organic total  | < 2 mg/l       |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l       |
| Duritate ca CaCO <sub>3</sub>                               | < 400 mg/l (*) |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l      |
| Total pesticide organofosforice                             | < 50 ng/l      |
| Total pesticide organofosforice plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l      |
| Clor organic total  | < 25 ng/l      |

(\*) Totuși, trebuie notat faptul că dacă se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța chimică testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai mică (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).

▼ **M6***Apendicele 5***Orientări privind efectuarea testului**

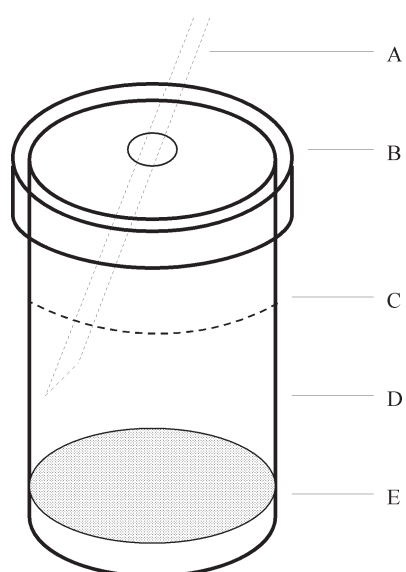
Exemplu de cușcă de reproducere:



- A: plasă în partea superioară și cel puțin pe una dintre părțile laterale ale cuștii (dimensiunea ochiurilor de aproximativ 1 mm)
- B: deschidere pentru introducerea adulților eclozați în interiorul cuștii de reproducere și pentru îndepărtarea maselor de ouă depuse din vasele de cristalizare (nu se indică în acest grafic)
- C: cuști de reproducere cu dimensiuni de minimum 30 cm lungime, 30 cm înălțime și 30 cm lățime

**▼ M6**

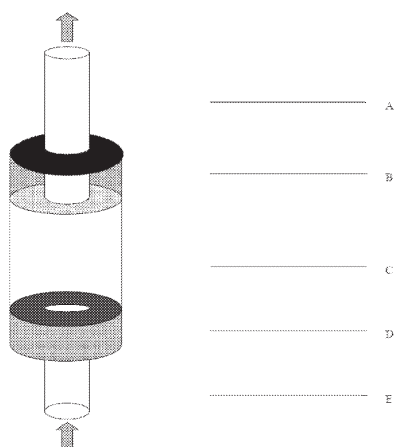
Exemplu de vas de testare:



- A: pipetă Pasteur pentru alimentarea cu aer a apei acoperitoare
- B: capac din sticlă pentru prevenirea evadării chironomidelor eclozate
- C: suprafața stratului de apă
- D: vas de testare (pahar de laborator din sticlă de minimum 600 ml)
- E: strat de sediment

▼ **M6**

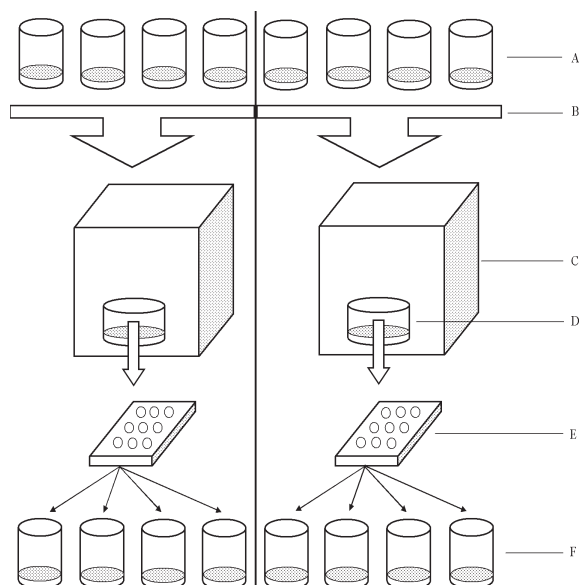
Exemplu de exhaustor pentru capturarea chironomidelor adulte (săgețile indica direcția fluxului de aer):



- A: eprubetă din sticlă (diametru interior de aproximativ 5 mm) conectat la o pompă cu autoamorsare
- B: dop din cauciuc vulcanizat, perforat cu tub din sticlă (A). În interior, deschiderea tubului de sticlă (A) este acoperită cu bumbac și o plasă (dimensiunea ochiurilor de aproximativ 1 mm) pentru a preveni deteriorarea chironomidelor atunci când acestea sunt aspirate în exhaustor
- C: recipient transparent (din plastic sau din sticlă, cu o lungime de aproximativ 15 cm) pentru chironomidele capturate
- D: dop din cauciuc vulcanizat, perforat cu tub (E). Pentru eliberarea chironomidelor în cușca de reproducere, sonda D se eliberează din recipientul C
- E: tub (din plastic sau din sticlă, cu un diametru interior de aproximativ 8 mm) pentru colectarea chironomidelor adulte din vas

▼ **M6**

Prezentare schematică a unui test care cuprinde ciclul de viață:



- A: prima generație – vasele de testare care conțin un sistem sediment-apă, opt replici, 20 de larve în primul stadiu larvar per vas
- B: patru vase de testare pentru fiecare cușcă de reproducere, A și B
- C: cuști de reproducere (A și B) pentru formare de roiuri, împerechere și depunere de ouă
- D: vase de cristalizare pentru depunerea șiragurilor de ouă
- E: microplăci, câte una pentru fiecare șirag de ouă
- F: a doua generație – vase de testare care conțin un sistem sediment-apă, opt replici, 20 de larve în primul stadiu larvar per vas.

## ▼ M6

## C.41. TEST DE DEZVOLTARE SEXUALĂ A PEȘTILOR

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 234 (2011). Ea se bazează pe o decizie din 1998 de dezvoltare a unor noi metode de testare sau de actualizare a metodelor de testare existente pentru screeningul și testarea potențialelor perturbatori endocrini. Testul de dezvoltare sexuală a peștilor (*Fish Sexual Development Test* – FSDT) a fost identificat ca o metodă de testare promițătoare care acoperă un stadiu de viață la pești receptiv la substanțe chimice estrogenice și androgenice. Metoda de testare a făcut obiectul unei validări interlaboratoare în perioada 2006 – 2010, prin ea fiind validate *Oryzias latipes*, peștezebra (*Danio rerio*) și ghidrinul (*Gasterosteus aculeatus*), *Pimephales promelas* fiind parțial validată (41)(42)(43). Acest protocol include *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștezebra. Protocolul reprezintă, în principiu, o îmbunătățire a Orientării TG nr. 210 a OCDE *Fish, Early Life Stage Toxicity Test* (Pește, Test de toxicitate în primele stadii de viață) (1), în cadrul căreia expunerea se continuă până când peștii se diferențiază sexual, adică aproximativ la 60 de zile de la eclozare (*days post-hatch* – dph) pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștezebra (perioada de expunere poate fi mai scurtă sau mai lungă pentru alte specii, care vor fi validate în viitor) și la care se adaugă parametri studiați care reflectă starea endocrină. FSDT evaluează efectele în primele stadii de viață și potențialele efecte negative ale substanțelor chimice presupuse a avea un efect de perturbare endocrină (de exemplu estrogeni, androgeni și inhibitori de steroidogeneză) asupra dezvoltării sexuale. Combinația celor doi parametri endocrini studiați principali, concentrația de vitelogenină (VTG) și raportul fenotipic între sexe permite testului să indice modul de acțiune al substanței chimice testate. Ca urmare a schimbării populațional relevante în raportul fenotipic al sexelor, FSDT poate fi utilizat pentru evaluarea pericolelor și a riscurilor. Cu toate acestea, în cazul în care testul este utilizat pentru evaluarea pericolelor sau a riscurilor, nu trebuie să se folosească ghidrinul deoarece datele de validare disponibile până în prezent au arătat că pentru această specie modificările raportului fenotipic al sexelor de către substanțele chimice testate au fost rare.
2. Protocolul se bazează pe pești expuși prin intermediul apei la substanțe chimice în timpul perioadei sexuale labile în care se așteaptă ca peștele să fie mai sensibil la efectele substanțelor chimice cu efect de perturbare endocrină care interferează cu dezvoltarea sexuală. Doi parametri studiați principali sunt măsurați ca indicatori ai anomaliilor de dezvoltare cauzate de efecte endocrine, concentrația de VTG și raportul între sexe (proportia sexelor) determinate prin intermediul histologiei gonadelor. Histopatologia gonadală (evaluarea și determinarea stadiilor ovocitelor și a celulelor spermatogenetice) este opțională. În plus, sexul genetic este determinat ori de câte ori este posibil (de exemplu, pentru *Oryzias latipes* și ghidrin). Prezența unui marker al sexului genetic constituie un avantaj considerabil deoarece crește puterea datelor statistice referitoare la raportul sexelor și permite detectarea inversării sexului fenotipic individual. Alți parametri studiați apicali care ar trebui măsurați includ rata de eclozare, supraviețuirea, lungimea și greutatea corporală. Metoda de testare ar putea fi adaptabilă la alte specii decât cele menționate mai sus, cu condiția ca celelalte specii să fie supuse unui proces de validare echivalent celui realizat pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștezebra, ca peștii de control să fie diferențiați sexual la sfârșitul testului, ca nivelurile de VTG să fie suficient de mari pentru a detecta variații semnificative determinate de substanțe chimice și ca sensibilitatea sistemului de testare să fie stabilită utilizând substanțe chimice de referință cu activitate endocrină [(anti)estrogenice, (anti)androgenice, inhibitori de aromatază etc.]. În plus, orice raport sau rapoarte de validare care se referă la datele FSDT utilizând alte specii trebuie să fie revizuit(e) de către OCDE, iar rezultatele validării trebuie să fie considerate ca satisfăcătoare.

## ▼ M6

**Considerații inițiale și limitări**

3. Vitelogenina (VTG) este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la estrogenul endogen circulant (2). Este un precursor al proteinelor din vitellus și, după ce este produsă în ficat, circulă în fluxul sanguin la ovar de unde este preluată și modificată de ovocitele în dezvoltare. Sinteza VTG este foarte limitată, deși detectabilă, la peștii imaturi și la peștii adulți masculi, deoarece acestora le lipsește estrogenul circulant suficient. Cu toate acestea, ficatul este capabil să sintetizeze și să secrete VTG ca răspuns la stimularea cu estrogen exogen (3)(4)(5).
4. Măsurarea VTG servește la detectarea substanțelor chimice cu moduri de acțiune estrogenice, antiestrogenice, androgenice și a substanțelor chimice care interferează cu steroidogeneza, ca de exemplu inhibitorii de aromatază. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției de VTG la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter pares*. Inducția de VTG a fost demonstrată și în urma expunerii la androgeni aromatizabili (6)(7). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17 $\beta$ -estradiol, determină o diminuare a concentrației de VTG, care este utilizată pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei sau, în sens mai larg, a inhibitorilor steroidogenezei (33). Relevanța biologică a răspunsului VTG ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este stabilită și a fost amplu documentată (8)(9). Cu toate acestea, este posibil ca producția de VTG la femele să fie, de asemenea, afectată de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine.
5. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate și standardizate cu succes pentru utilizarea de rutină în vederea cuantificării VTG în eșantioanele de sânge, ficat, organism întreg sau omogenat din cap/coadă colectate de la pești individuali. Acesta este cazul pentru peștele-zebră, ghidrinii și *Oryzias latipes*, precum și pentru specia parțial validată *Pimephales promelas*; există disponibile metode testare prin imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA) specifice de specie, care utilizează imunochimia pentru cuantificarea VTG (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). Pentru *Oryzias latipes* și peștele-zebră există o corelație bună între VTG măsurată din eșantioane de plasmă sanguină, ficat și omogenat, deși acestea din urmă tind să arate valori ușor mai mici decât plasma (17)(18)(19). Apendicele 5 conține procedurile recomandate pentru prelevările de eșantioane efectuate în scopul analizei VTG.
6. Schimbarea raportului fenotipic al sexelor (proportia sexelor) constituie un parametru studiat care reflectă inversarea sexelor. În principiu, substanțele chimice cu efect estrogenic, antiestrogenic, androgenic, antiandrogenic și de inhibare a steroidogenezei pot afecta raportul sexelor la peștii în dezvoltare (20). S-a arătat că această inversare a sexelor este parțial reversibilă în cazul peștelui-zebră (21) în urma expunerii la o substanță chimică cu efect estrogenic, în timp ce inversarea sexelor în urma expunerii la substanțe chimice cu efect androgenic este permanentă (30). Sexul este definit ca femelă, mascul, hermafrodit (ovocite și celule spermatogenetice într-o singură gonadă) sau nediferențiat, determinat la pești individuali prin examinarea histologică a gonadelor. Orientări sunt furnizate în apendicele 7 și în documentul intitulat *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (Document OCDE de orientare privind diagnosticul histopatologiei influențate endocrin a gonadelor de pește) (22).
7. Sexul genetic este examinat prin markeri genetici atunci când aceștia există la o anumită specie de pești. În ceea ce privește *Oryzias latipes*, genele de femele XX sau de masculi YY pot fi detectate prin metoda reacției în lanț a



▼ **M6**

polimerazei (PCR) sau poate fi analizată gena domeniului DM legată de Y (DMY) (DMY negativ sau pozitiv) astfel cum se descrie în (23)(24). În ceea ce privește ghidrinul, există o metodă echivalentă metodei PCR pentru determinarea sexului genetic, descrisă în apendicele 10. În cazul în care sexul genetic poate fi legat în mod individual de sexul fenotipic, puterea testului este îmbunătățită și, prin urmare, sexul genetic trebuie determinat la specii cu markeri ai sexului genetic documentați.

8. Cei doi parametri studiați endocrini principali, VTG și raportul sexelor, pot demonstra, în combinație, modul de acțiune endocrin (MOA) al substanței chimice (tabelul 1). Raportul sexelor este un biomarker relevant pentru populație (25)(26) și pentru unele moduri de acțiune bine definite, rezultatele FSDT pot fi utilizate în scopul evaluării pericolelor și a riscurilor dacă se consideră necesar de către agenția de reglementare. Aceste moduri de acțiune sunt în prezent cele cu efect estrogenic, androgenic și de inhibare a steroidogenezei.

Table 1

**Reacția parametrilor endocrini studiați la diferite moduri de acțiune ale substanțelor chimice:**

↑ = creștere, ↓ = scădere, — = neinvestigată

| MOA                         | VTG ♂   | VTG ♀   | Raportul sexelor     | Referințe |
|-----------------------------|---------|---------|----------------------|-----------|
| Agonist estrogenic slab     | ↑       | ↑       | ↑♀ sau ↑Nedif        | (27)(40)  |
| Agonist estrogenic puternic | ↑       | ↑       | ↑♀ sau ↑Nedif, Nr. ♂ | (28)(40)  |
| Antagonist estrogenic       | —       | —       | ↓♀, ↑Nedif           | (29)      |
| Agonist androgenic          | ↓ sau — | ↓ sau — | ↑♂, Nr. ♀            | (28)(30)  |
| Antagonist androgenic       | —       | —       | ↑♀<br>↑Hermafrodit   | (31)      |
| Inhibitor al aromatazei     | ↓       | ↓       | ↓♀                   | (33)      |

9. FSDT nu cuprinde stadiul de viață reproductiv al peștilor și, prin urmare, substanțele chimice care se presupune că afectează reproducerea la concentrații mai mici decât dezvoltarea sexuală trebuie să fie examinate în cadrul unui test care să cuprindă reproducerea.
10. Definițiile utilizate în scopul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.
11. Testul FSDT *in vivo* este destinat detectării substanțelor chimice cu proprietăți androgenice și estrogenice, precum și cu proprietăți antiandrogenice, antiestrogenice și de inhibare a steroidogenezei. Fazele de validare a FSDT (1 și 2) au cuprins substanțele chimice cu proprietăți estrogenice, androgenice și de inhibare a steroidogenezei. Efectele în cadrul FSDT ale antagoniști estrogenici și androgenici sunt ilustrate în tabelul 1, dar aceste MOA sunt mai puțin documentate în prezent.

#### PRINCIPIUL TESTULUI

12. În cadrul testului, sunt expuși pești, din ouă recent fertilizate, până la finalizarea diferențierii sexuale, la cel puțin trei concentrații ale substanței chimice testate dizolvate în apă. Testul trebuie să se desfășoare în flux continuu, cu excepția cazului în care nu este posibil din cauza disponibilității sau naturii (de exemplu, solubilitate limitată) a substanței testate. Testul începe cu introducerea ouălor nou fertilizate (înainte de divizarea

**▼ M6**

discului embrionar) în camerele de testare. Încărcarea camerelor este descrisă pentru fiecare specie la punctul 27. Pentru speciile de pești validate, *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștele-zebră, testul se termină la 60 dph. La terminarea testului, toți peștii sunt eutanasiați. Un eșantion biologic (plasmă sanguină, ficat sau omogenat cap/coadă) este colectată pentru analiza VTG din fiecare pește, iar partea rămasă este fixată pentru evaluarea histologică a gonadelor în vederea determinării sexului fenotipic; opțional, se poate realiza histopatologia (de exemplu determinarea stadiului gonadelor, severitatea hermafroditismului). Se prelevează un eșantion biologic (din înotătoarea anală sau dorsală) pentru determinarea sexului genetic la specii care posedă markeri adecvați (apendicele 9 și 10).

13. O prezentare generală a condițiilor de testare relevante specifice pentru speciile validate: *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștele-zebră, este furnizată în appendicele 2.

#### INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

14. Rezultatele unui test de toxicitate acută sau ale unui alt test de toxicitate pe termen scurt [de exemplu, metoda de testare C.14 (34) și Orientarea TG nr. 210 a OCDE (1)] efectuate de preferință cu speciile alese pentru acest test, trebuie să fie disponibile. Aceasta înseamnă că se cunosc solubilitatea în apă și presiunea vaporilor substanței chimice testate, precum și că există disponibilă o metodă analitică fiabilă pentru cuantificarea substanței chimice în camerele de testare, a cărei acuratețe și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute.
15. Alte informații utile includ formula structurală, puritatea substanței chimice, stabilitatea în apă și la lumină, pKa, P<sub>ow</sub> și rezultatele unui test privind ușurința biodegradabilității (metoda de testare C.4) (35).

#### Criteriile de acceptare a testului

16. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:
  - Concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (ASV) pe toată durata testului,
  - Temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de  $\pm 1,5$  °C între camerele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută în intervalul de temperatură specificat pentru specia testată (apendicele 2);
  - O metodă validată pentru analiza substanței chimice de expunere cu o limită de detecție cu mult sub cea mai mică concentrație nominală trebuie să fie disponibilă și trebuie colectate dovezi pentru a demonstra că respectivele concentrații ale substanței chimice testate în soluție au fost menținute în mod satisfăcător în intervalul de  $\pm 20$  % din valorile medii măsurate;
  - Supraviețuirea generală a ouălor fertilizate în controale și, dacă este relevant, în controalele cu solvent, trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în appendicele 2;
  - Criteriile de acceptare legate de creștere și proporțiile sexelor la terminarea testului se bazează pe date obținute din grupurile de control (controale cu solvent și apă agregate, cu excepția cazului în care sunt semnificativ diferite, când sunt utilizate doar cele cu solvent):

## ▼ M6

|   |   | Oryzias latipes | peștele zebură | ghidrin   |
|---|---|-----------------|----------------|-----------|
| Creștere                                | Greutatea umedă a peștilor, uscați prin tamponare | > 150 mg        | > 75 mg        | > 120 mg  |
|   | Lungime (lungime standard)                        | > 20 mm         | > 14 mm        | > 20 mm   |
| Raportul sexelor (% masculi sau femele) |   | 30 – 70 %       | 30 – 70 %      | 30 – 70 % |

- Atunci când se utilizează un solvent, acesta nu trebuie să aibă niciun efect semnificativ statistic asupra supraviețuirii și nu trebuie să producă nicio perturbare endocrină sau să aibă alte efecte adverse asupra stadiilor timpurii de viață, astfel cum se indică prin controlul cu solvent.

Dacă se observă o abatere de la criteriile de acceptare a testului, consecințele trebuie să fie luate în considerare în relație cu fiabilitatea datelor testului, iar aceste considerente trebuie incluse în raport.

## DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

### Camerele de testare

17. Poate fi utilizată orice cameră de testare din sticlă, oțel inoxidabil sau dintr-un alt material chimic inert. Dimensiunile camerelor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite respectarea vitezei de încărcare menționate mai jos. Se recomandă poziționarea aleatorie a camerelor de testare în zona de testare. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor cu fiecare concentrație prezentă în fiecare bloc este de preferat unui protocol complet aleatoriu. Camerele de testare trebuie protejate împotriva oricărei perturbări nedorite.

### Alegerea speciei

18. În appendicele 2 se află o listă de specii de pești recomandate. Procedura necesară includerii de noi specii este furnizată la punctul 2.

### Menținerea peștilor parentali

19. Detalii privind menținerea peștilor parentali în condiții satisfăcătoare pot fi găsite în Orientarea TG nr. 210 a OCDE (1). Peștii parentali trebuie hrăniți o dată sau de două ori pe zi cu hrană adecvată.

### Manipularea embrionilor și a larvelor

20. Inițial, embrionii și larvele pot fi expuse în cadrul unei camere principale în camere mai mici din sticlă sau din oțel inoxidabil, prevăzute cu plase laterale sau la capete pentru a permite fluxul substanței chimice testate în cameră. Curgerea neturbulentă prin aceste camere de mici dimensiuni poate fi indusă prin suspendarea lor de un braț mobil, care le deplasează în sus și în jos, dar astfel încât să mențină organismele imersate.
21. Când au fost folosite recipiente, grile sau plase pentru a păstra ouăle în camera principală de testare, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor, cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica peștii să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer, iar plasele nu trebuie utilizate pentru a elibera peștii din recipientele pentru ouă. Momentul transferului variază în funcție de specie, iar transferul nu este întotdeauna necesar.

**▼ M6****Apă**

22. Orice apă în care specia de testare prezintă supraviețuirea controlului cel puțin la fel de bună ca în apa descrisă în apendicele 3 este adecvată ca apă de testare. Trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Pentru ca apa de diluție să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin reacție cu substanța chimică testată) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie prelevate periodic eșantioane pentru analiză. Carbonul organic total, conductivitatea, pH-ul și materiile solide în suspensie se măsoară, de exemplu, la fiecare trei luni dacă se știe că apa de diluție este relativ constantă în calitate. Trebuie efectuate măsurători ale metalelor grele (de exemplu Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), ale anionilor și cationilor majori (de exemplu  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) și ale pesticidelor, dacă calitatea apei este îndoielnică. Detalii privind analiza substanței chimice și colectarea apei pot fi găsite la punctul 34.

**Soluții de testare**

23. Sistemul cu flux continuu trebuie utilizat dacă este posibil din punct de vedere practic. Pentru testele în regim de flux continuu este necesar un sistem care să disperseze și să dilueze continuu o soluție stoc de substanță chimică testată (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura o serie de concentrații în camerele de testare. Debitul soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin de cinci ori volumul unei camere, în 24 de ore, este considerat adecvat (1). Trebuie avut grijă să se evite folosirea de țevi din plastic sau alte materiale, dintre care unele pot conține substanțe active din punct de vedere biologic sau care ar putea absorbi substanța chimică testată.
24. Soluția stoc se prepară de preferință, fără folosirea de solvenți, prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice testate în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau ultrasunete). În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de dizolvat în apă, trebuie urmate procedurile descrise în documentul *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures should be followed* (Document OCDE de orientare privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile) (36). În unele cazuri, folosirea solvenților trebuie evitată, însă aceasta poate fi necesară în unele cazuri pentru a realiza o soluție stoc cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți corespunzători sunt oferite în referința (36).
25. Condițiile de testare semistatice trebuie evitate, cu excepția cazurilor când este furnizată o argumentație privind motivele imperioase asociate cu substanța chimică testată (de exemplu, stabilitatea, disponibilitatea limitată, costul ridicat sau pericolul). Pentru tehnicile semistatice, pot fi urmate două proceduri de reînnoire diferite. Fie sunt preparate noi soluții de testare în camere curate, iar ouăle și larvele care au supraviețuit sunt transferate cu grijă în noile camere, fie organismele de testare sunt reținute în camerele de testare în timp ce o porție (cel puțin două treimi) din apa de testare este schimbată zilnic.

**PROCEDURA****Condiții de expunere***Colectarea ouălor și durata*

26. Pentru evitarea rezultatelor incorecte din cauze genetice, ouăle sunt colectate de la un minimum trei cupluri sau grupuri reproducătoare, amestecate și selectate în mod aleatoriu pentru a începe testul. Pentru ghidrin, a se vedea descrierea fertilizării artificiale din apendicele 11. Testul ar trebui să înceapă cât mai curând posibil după ce ouăle au fost fertilizate,

▼ **M6**

embrionii fiind de preferință scufundați în soluțiile de testare înainte de începerea divizării discului embrionar sau cât mai aproape posibil după această etapă și nu mai târziu de 12 ore de la fertilizare. Testul ar trebui să continue până la finalizarea diferențierii sexuale în grupul de control (60 dph pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștele-zebră).

*Încărcare*

27. Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie de cel puțin 120 per concentrație împărțite între minimum 4 replici (este acceptată alocarea radicalică la control). Ouăle trebuie să fie distribuite în mod aleatoriu (prin utilizarea tabelelor statistice pentru procedura aleatorie) între tratamente. Viteza de încărcare (pentru definiție, a se vedea apendicele 1) trebuie să fie suficient de mică pentru ca o concentrație de oxigen dizolvat de cel puțin 60 % din ASV să poată fi menținută fără aerarea directă a camerelor. Pentru testele în flux continuu este recomandată o viteză de încărcare care să nu depășească 0,5 g/l în 24 de ore și 5 g/l de soluție în orice moment. Nu mai târziu de 28 zile de la fertilizare numărul de pești per replică trebuie redistribuit, astfel încât fiecare replică să conțină un număr egal de pești, în măsura în care este posibil. Dacă survine mortalitate asociată expunerii, numărul de replici trebuie redus în mod corespunzător, astfel încât densitatea peștilor între nivelurile de tratament să se mențină egală, în măsura în care este posibil.

*Lumina și temperatura*

28. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (a se vedea apendicele 2 pentru condițiile experimentale pentru FSDT).

*Hrănire*

29. Hrana și hrănirea sunt critice, și este esențial administrarea unei hrane corecte pentru fiecare etapă la intervale adecvate de timp și la un nivel suficient pentru a susține creșterea normală. Hrănirea ar trebui să se realizeze *ad libitum* minimalizând surplusul. Pentru a obține o viteză de creștere suficientă, peștii trebuie hrăniți cel puțin de două ori pe zi (se acceptă o dată pe zi în weekend), cu o diferență de cel puțin trei ore între fiecare administrare de hrană. Surplusul de hrană și excrementele trebuie îndepărtate, după necesități, pentru a evita acumularea de deșeuri. Pe măsură ce se dobândește experiență, hrănirea și regimurile de hrănire sunt în permanență perfecționate pentru a îmbunătăți supraviețuire și pentru a optimiza creșterea. Prin urmare, regimul propus ar trebui confirmat de experți recunoscuți. Hrănirea trebuie oprită cu 24 de ore înainte de finalizarea testului. Exemple de hrană adecvată sunt prezentate în apendicele 2 [a se vedea de asemenea OECD *Fish Testing Framework* (39)]

**Concentrațiile testate**

30. Substanțele chimice testate trebuie spațiate astfel cum se descrie în apendicele 4. Trebuie utilizate cel puțin trei concentrații de testare în cel puțin patru replici. La alegerea intervalului de concentrații de testare trebuie luată în considerare curba reprezentând LC<sub>50</sub> în funcție de perioada de expunere rezultată din studiile de toxicitate acută. Dacă datele urmează să fie folosite pentru evaluarea riscurilor, se recomandă cinci concentrații de testare.
31. Concentrațiile de substanță chimică mai mari de 10 % din concentrația acută la adulți LC<sub>50</sub> sau 10 mg/l, oricare este mai mică, nu trebuie să fie testate. Concentrația de testare maximă trebuie să fie de 10 % din LC<sub>50</sub> pentru larve/exemplare tinere.

**▼ M6****Controale**

32. Un control cu apă de diluție ( $\geq 4$  replici) și, dacă este relevant, un control cu solvent ( $\geq 4$  replici) trebuie utilizate în plus față de concentrațiile de testare. Numai solvenții care au fost analizați și s-a demonstrat că nu au nicio influență statistic semnificativă asupra parametrilor studiați trebuie să fie utilizați în testare.
33. În cazul în care se folosește un solvent, concentrația sa finală nu trebuie să fie mai mare de 0,1 ml/l (36) și trebuie să aibă aceeași concentrație în toate camerele de testare, cu excepția controlului cu apă de diluție. Cu toate acestea, trebuie depuse eforturi pentru a evita utilizarea de astfel de solvenți sau pentru a menține concentrațiile solventului la o valoare minimă.

**Frecvența determinărilor și măsurărilor analitice**

34. Analiza chimică a substanței chimice testate trebuie efectuată înainte de începerea testului pentru a verifica respectarea criteriilor de acceptanță. Toate replicile trebuie analizate individual la începutul și la terminarea testului. O replică pe concentrație de testare trebuie analizată cel puțin o dată pe săptămână pe durata testului, făcând schimbări sistematice între replici (1,2,3,4,1,2...). În cazul în care eșantioanele sunt depozitate pentru a fi analizate ulterior, metoda de depozitare a eșantioanelor trebuie să fie validată în prealabil. Eșantioanele trebuie filtrate (de exemplu, utilizând un filtru cu pori de 0,45  $\mu\text{m}$ ) sau centrifugate pentru a se asigura că determinările sunt realizate pe substanța chimică din soluția veritabilă.
35. Pe durata testării, oxigenul dizolvat, pH-ul, duritatea totală, conductivitate, salinitatea (dacă este relevantă) și temperatura trebuie să fie măsurate în toate camerele de testare. Ca o condiție minimă, oxigenul dizolvat, salinitatea (dacă este relevantă) și temperatura trebuie să fie măsurate săptămânal, iar pH-ul, conductivitatea și duritatea la începutul și la sfârșitul testului. De preferință, temperatura trebuie să fie monitorizată continuu cel puțin într-una dintre camerele de testare.
36. Rezultatele trebuie să se bazeze pe concentrațiile măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței chimice testate în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de  $\pm 20\%$  din concentrația nominală, rezultatele pot fi bazate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.

**Observații și măsurători***Stadiul dezvoltării embrionare*

37. Expunerea trebuie să înceapă imediat ce este posibil după fertilizare și înainte de începerea divizării discului embrionar și nu mai târziu de 12 ore de la fertilizare pentru a asigura expunerea pe durata stadiului de dezvoltare embrionară timpurie.

*Eclozarea și supraviețuirea*

38. Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să fie făcute cel puțin o dată pe zi și numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. Embrionii, larvele și exemplarele tinere de pești morți trebuie îndepărtate imediat după ce au fost observate întrucât se pot descompune rapid și pot fi dezintegrate prin acțiunile altor pești. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu lovi sau leza fizic ouăle/larvele din vecinătate, acestea fiind extrem de delicate și de sensibile. Simptomele care indică moartea variază în funcție de stadiul de viață:

— pentru ouă: în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a transparenței și schimbarea colorației, provocată de coagularea și/sau precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;

**▼ M6**

- pentru larve și exemplarele tinere de pești: imobilitatea și/sau absența mișcărilor respiratorii și/sau absența bătăilor inimii și/sau colorația alb-opacă a sistemului nervos central și/sau absența reacției la stimuli mecanici.

*Aspectul anormal*

39. Numărul de larve sau de pești care prezintă anomalii legate de forma corpului trebuie înregistrat, iar aspectul și natura anomaliilor trebuie descrise. Trebuie remarcat că embrionii și larve anormale apar în mod natural și numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile de control ale unor specii. Animalele anormale nu trebuie îndepărtate din camerele de testare decât atunci când sunt moarte. Cu toate acestea, în conformitate cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, dacă anomaliile duc la durere, suferință și stres sau vătămări de durată, iar moartea poate fi prezisă în mod fiabil, animalele trebuie anesteziate și eutanasiate în conformitate cu descrierea de la punctul 44 și considerate a contribui la mortalitate în analiza datelor.

*Comportamentul anormal*

40. Anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat, imobilitatea sau hrănirea atipică trebuie înregistrate la capitolul aspect.

*Greutate*

41. La sfârșitul testului, toți peștii supraviețuitori trebuie eutanasiați (anesteziați dacă trebuie prelevate de eșantioane de sânge), iar greutatea umedă individuală (uscarea prin tamponare) trebuie măsurată.

*Lungime*

42. La sfârșitul testului, lungimile individuale (lungimea standard) trebuie măsurate.
43. Aceste observații vor face ca o parte sau toate datele următoare să fie disponibile pentru raportare.

— mortalitatea cumulată;

— numărul de pești sănătoși la sfârșitul testului;

— timpul până la începerea eclozării și până la sfârșitul eclozării;

— lungimea și greutatea animalelor supraviețuitoare;

— numărul larvelor deformate;

— numărul peștilor care prezintă un comportament anormal.

**Eșantionarea peștilor**

44. Eșantionarea peștilor se realizează la terminarea testului. Peștii eșantionați trebuie eutanasiați cu, de exemplu, MS-222 (100 – 500 mg per l tamponat cu 200 mg NaHCO<sub>3</sub> per l) sau FA-100 (4-alil-2-metoxifenol: eugenol) și măsurati și cântăriți individual ca greutate umedă (uscarea prin tamponare) sau anesteziați dacă un eșantion de sânge trebuie prelevat (a se vedea punctul 49).

**Selectarea pentru analiza VTG și determinarea sexului prin evaluarea histologică**

45. Toți peștii trebuie eșantionați și pregătiți pentru analiza sexului și a VTG. Toți peștii trebuie analizați histologic în vederea determinării sexului. Pentru măsurarea VTG, se acceptă un subeșantion de cel puțin 16 pești din fiecare

▼ **M6**

replică. Mai mulți pești trebuie analizați pentru a determina VTG dacă rezultatele obținute în urma subeșantionării sunt neclare.

46. Procedura de eșantionare pentru VTG și determinarea sexului depinde de metoda de analiză a VTG:

*Metoda cu omogenat cap/coadă pentru analiza VTG*

47. Peștele este eutanasiat. Capul și coada fiecărui pește se separă de corpul peștelui prin incizii imediat înapoia înotătoarelor pectorale și imediat înaintea înotătoarei dorsale, cu ajutorul unui bisturiu (a se vedea figura 1). Capul și coada fiecărui pește sunt comasate, cântărite și numerotate individual, congelate în azot lichid și depozitate la  $-70^{\circ}$  sau mai puțin, pentru analiza VTG. Corpul peștelui este numerotat și fixat într-un fixativ adecvat pentru evaluarea histologică (22). Prin utilizarea acestei metode sunt evaluate VTG și histopatologia pentru fiecare individ și o posibilă modificare a nivelului VTG poate fi astfel corelată cu sexul fenotipic al peștilor sau cu sexul genetic (*Oryzias latipes* și ghidrin) al peștilor. Pentru informații suplimentare a se vedea orientările privind omogenizarea (apendicele 5) și orientările privind cuantificarea VTG (apendicele 6).

*Metoda cu omogenat din ficat pentru analiza VTG*

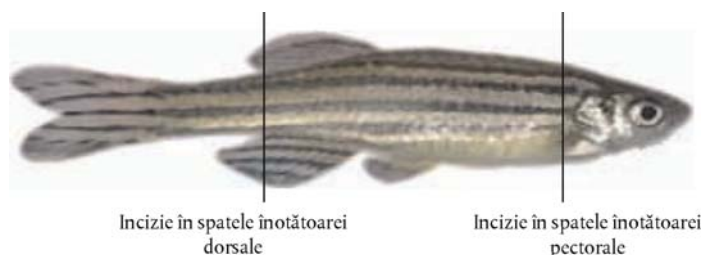
48. Peștele este eutanasiat. Ficatul este excizat și depozitat la o temperatură de  $-70^{\circ}\text{C}$  sau mai mică. Procedurile recomandate pentru excizia ficatului și pretratarea sunt disponibile în Orientarea TG nr. 229 a OCDE (37) sau în capitolul C.37 din prezenta anexă (38). Ficații sunt apoi omogenizați individual, astfel cum se descrie în Orientarea TG nr. 229 a OCDE sau în capitolul C.37 din prezenta anexă. Supernatantul colectat este folosit pentru măsurarea VTG cu o tehnică ELISA omoloagă [a se vedea appendicele 6 pentru un exemplu de cuantificare la peștele-zebră sau Orientarea TG nr. 229 a OCDE (37) pentru *Oryzias latipes*]. Pe baza acestei metode, este posibil, de asemenea, să se obțină date individuale privind peștii atât în ceea ce privește VTG, cât și în ceea ce privește histologia gonadelor.

*Metoda cu plasmă sanguină pentru analiza VTG*

49. Sângele este colectat de la peștii anesteziați prin puncție cardiacă, din venă caudală sau prin tăierea cozii și este centrifugat la  $4^{\circ}\text{C}$  pentru colectarea de plasmă. Plasma este depozitată la maximum  $-70^{\circ}\text{C}$ , până la utilizare. Peștele întreg este eutanasiat și fixat pentru histologie. Atât eșantioanele de plasmă, cât și peștii, sunt numerotați individual pentru a corela nivelurile de VTG cu sexul peștelui.

Figura 1

**Modul de incizare a unui pește pentru măsurarea VTG în omogenat din cap/coadă și evaluarea histologică a secțiunii mijlocii.**





▼ **M6***Determinarea sexului genetic*

50. Un eșantion biologic pentru determinarea sexului genetic este prelevat din pești aparținând speciilor care posedă markeri corespunzători. Pentru *Oryzias latipes*, se colectează înotătoarea anală sau înotătoarea dorsală. O descriere detaliată este furnizată în apendicele 9 incluzând prelevarea de eșantioane de țesut și determinarea sexului printr-o metodă PCR. De asemenea, pentru ghidrin, o descriere a prelevării de țesut și a determinării sexului prin metoda PCR este furnizată în apendicele 10.

**Măsurarea VTG**

51. Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă cantitativă, validată din punct de vedere analitic. Informațiile trebuie să fie disponibile pe baza variabilității intra- și interteste a metodei utilizate într-un anumit laborator. Sursa variabilității intra- și interlaboratoare este (cel mai probabil) bazată pe diferențele stadii de dezvoltare a populației de pești. Luând în considerare variabilitatea măsurării VTG, NOEC bazate doar pe acest parametru studiat trebuie tratate cu multă atenție. Sunt disponibile diferite metode pentru evaluarea producerii de VTG în speciile de pești avute în vedere în acest test. O tehnică de măsurare care este relativ sensibilă și specifică este determinarea concentrațiilor de proteine prin intermediul unui test de imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA). Anticorpi omologi (formați împotriva VTG de la aceeași specie) și cele mai importante standarde omologe trebuie utilizate.

**Determinarea sexului**

52. În funcție de procedura de eșantionare a VTG, întregul pește sau secțiunea mijlocie rămasă a fiecărui pește se plasează într-o casetă de procesare etichetată în prealabil și fixată într-un fixator corespunzător pentru determinarea histologică a sexului (opțional și pentru evaluare stadializării gonadale). Orientări privind fixarea și integrarea sunt furnizate în apendicele 7, precum și în documentul intitulat *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (Document OCDE de orientare privind diagnosticul histopatologiei influențate endocrin a gonadelor de pește) (22). După procesare, peștele este integrat în blocuri de parafină. Indivizii trebuie plasați în blocurile de parafină în poziție longitudinală. Cel puțin șase secțiuni longitudinale (cu o grosime de 3 – 5 μm) într-un plan frontal incluzând țesut gonadal de la ambele gonade sunt realizate pentru fiecare individ. Intervalul dintre aceste secțiuni trebuie să fie de aproximativ 50 μm pentru masculi și de 250 μm pentru femele. Totuși, având în vedere că fiecare bloc va conține adesea masculi și femele (dacă în fiecare bloc sunt integrați mai mulți indivizi), intervalul dintre secțiunile acestor blocuri trebuie să fie de aproximativ 50 μm până la obținerea a cel puțin șase secțiuni ale gonadelor pentru fiecare mascul. Prin urmare, intervalul dintre secțiuni poate fi crescut până la aproximativ 250 μm pentru femele. Secțiunile sunt colorate cu hematoxilină și eozină și examinate la microscop optic cu o atenție deosebită acordată sexului (mascul, femelă, hermafrodit sau exemplar nediferențiat). Hermafrodit înseamnă prezența mai multor ovocite în testicul per șase secțiuni analizate sau celule spermatogenetice (da/nu) în ovare. Histopatologia și stadializarea ovarelor și a testiculelor este opțională, însă dacă sunt investigate, rezultatele trebuie analizate statistic și raportate. Trebuie remarcat faptul că unora dintre speciile de pești le lipsește în mod natural o pereche de gonade complet dezvoltate și poate fi prezentă doar o singură gonadă (de exemplu *Oryzias latipes*, ocazional, peștele-zebră). Toate aceste observațiile trebuie înregistrate.

53. Determinarea sexului genetic pentru exemplarele de *Oryzias latipes* se bazează pe prezența sau pe absența genei care determină sexul masculin la *Oryzias latipes*, DMY, care este situată pe cromozomul Y. Sexul

▼ **M6**

genotipic al *Oryzias latipes* poate fi identificat prin secvențierea genei DMY din ADN-ul extras din, de exemplu, o bucată de înotătoare anală sau dorsală. Prezența DMY indică un exemplar XY (mascul) indiferent de fenotip, în timp ce absența DMY indică un exemplar XX (femelă), indiferent de fenotip (23). Orientări privind pregătirea țesutului și metoda PCR sunt furnizate în apendicele 9. Determinarea sexului genetic în exemplarele de ghidrin se realizează, de asemenea, printr-o metodă PCR, descrisă în apendicele 10.

54. Apariția de exemplare hermafrodite (pentru definiție, a se vedea apendicele 1) trebuie înregistrată.

#### **Caracteristici sexuale secundare**

55. Caracteristicile sexuale secundare se află sub controlul endocrin la specii precum *Oryzias latipes*; prin urmare, dacă este posibil, observațiile privind aspectul fizic al peștelui trebuie să fie efectuate la sfârșitul expunerii. În ceea ce privește *Oryzias latipes*, formarea papilară a părții posterioare a înotătoarei anale la femele este sensibilă la androgen. Capitolul C. 37 din prezenta anexă (38) furnizează fotografii relevante ale caracteristicilor sexuale secundare masculine și ale femelelor androgenizate.

#### **DATE ȘI RAPORTARE**

##### **Tratamentul rezultatelor**

56. Este important ca cel mai puternic test statistic valid să determine parametrul studiat. Replica este unitatea experimentală, însă variabilitatea între replici trebuie inclusă în testarea statistică. O organigramă a deciziilor este disponibilă în apendicele 8 pentru a ajuta cu testul statistic cel mai potrivit pentru a fi utilizat pe baza caracteristicilor datelor obținute în test. Nivelul de semnificație statistică este de 0,05 pentru toți parametri studiați incluși.

#### **Proporțiile sexelor și sexul genetic**

57. Proporțiile sexelor ar trebui să fie analizate din punctul de vedere al efectului semnificativ (metoda NOEC/LOEC) al expunerii prin Jonckheere-Terpstra (testul Trend), în cazul în care există o relație doză-răspuns monotonă. Dacă se constată absența monotonicității, trebuie aplicat un test pe perechi: Dacă se poate obține normalitate și varianță omogenă se utilizează testul Dunnett. Dacă este prezentă o varianță eterogenă, se utilizează testul Tamhane-Dunnett. Altfel, se utilizează testul exact Mann-Whitney cu ajustare Bonferroni-Holm. O organigramă care descrie statistica proporțiilor sexelor este furnizată în apendicele 8. Proporțiile sexelor trebuie prezentate în tabele ca proporții de concentrații  $\pm$  SD pentru masculi, femele, hermafrodiți și exemplare nediferențiate. Semnificația statistică trebuie evidențiată. În raportul de validare a fazei 2 a FSDT sunt prezentate exemple (42). Sexul genetic trebuie raportat ca procent de inversări ale sexului fenotipic al masculilor, femelelor, hermafrodiților și exemplarelor nediferențiate.

#### **Concentrațiile VTG**

58. Concentrațiile VTG trebuie analizate din punctul de vedere al efectului semnificativ (metoda NOEC/LOEC) al expunerii. Testul Dunnett este preferabil testului t cu corecție Bonferroni. În cazul aplicării unei corecții Bonferroni, se recomandă corecția Bonferroni-Holm. Trebuie realizată o ajustare pentru transformarea logaritmică a VTG pentru a obține normalitate și omogenitatea varianței. Apoi, dacă relația concentrație-răspuns este compatibilă cu monotonicitatea, se preferă testul Jonckheere Terpstra față de oricare dintre cele de mai sus. În cazul în care sunt utilizate teste t sau testul Dunnett, nu este necesară efectuarea unui test F de semnificație ANOVA pentru a continua. Pentru detalii, a se vedea organigrama din

**▼ M6**

pendicele 8. Rezultatele trebuie raportate în tabele ca medii de concentrații  $\pm$  SD separat pentru masculi, femele, hermafrodiți și exemplarele nediferențiate. Semnificativitatea statistică pentru femelele fenotipice și masculii fenotipici trebuie evidențiată. În raportul de validare a fazei 2 a FSDT sunt prezentate exemple (42).

**Concentrațiile efective ale substanței chimice testate**

59. Concentrațiile efective din cameră ale substanței chimice testate trebuie analizate cu frecvențele descrise la punctul 34. Rezultatele trebuie raportate în tabele sub formă de concentrații medii  $\pm$  SD per replică, precum și per concentrație, împreună cu informații privind numărul de eșantioane și cu valorile aberante pentru concentrația medie de tratament  $\pm$  20 % evidențiată. Exemple pot fi găsite în raportul de validare a fazei 2 a FSDT (42).

**Interpretarea rezultatelor**

60. Rezultatele testului se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanței chimice testate apar la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice.

**Raportul privind testul**

61. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

*Substanța chimică testată*

- Proprietățile fizico-chimice relevante; datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică pentru cuantificare a substanței chimice testate.

*Condițiile de testare*

- Procedura de testare utilizată (de exemplu cu flux continuu, semistatică/reînnoire); protocolul de testare inclusiv concentrațiile de testare, metoda de preparare a soluțiilor stoc (într-o anexă), frecvența de reînnoire (dacă se utilizează, trebuie indicat agentul de solubilizare și concentrația acestuia);
- Concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în camerele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute (metoda de analiză utilizată trebuie prezentată într-o anexă); dovada că măsurătorile se referă la concentrațiile de substanțe chimice testate în soluție veritabilă;
- Calitatea apei în camerele de testare: pH-ul, duritatea, temperatura și concentrația de oxigen dizolvat;
- Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul (tipurile) de hrană, sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele contaminanților (de exemplu, PCBs, PAHs și pesticide organoclorurate), dacă sunt relevante].

*Rezultate*

- Dovada că controalele au îndeplinit criteriile de validitate: datele privind rata de eclozare trebuie prezentate în tabele ca procente per replică și per concentrație. Valorile aberante din criteriile de acceptanță (în controale) trebuie evidențiate. Supraviețuirea trebuie prezentată ca procent per replică și per concentrație. Valorile aberante din criteriile de valabilitate (în controale) trebuie evidențiate;
- Indicarea clară a rezultatelor obținute privind diferenții parametri studiați observați: supraviețuire embrionilor și succesul eclozării; anomalii externe; lungime și greutate; măsurători ale VTG (ng/g omogenat, ng/ml plasmă sau ng/mg ficat); histologia gonadelor, raportul sexelor,

▼ **M6**

datele privind sexul genetic; incidența reacțiilor neobișnuite per pește și orice efect vizibil produs de substanța chimică testată.

62. Rezultatele trebuie prezentate ca valori medii  $\pm$  deviație standard (*standard deviation* – SD) sau eroare standard (*standard error* – SE). Statisticile trebuie raportate minimum ca NOEC și LOEC și intervale de încredere. Organigrama statistică (apendicele 8) trebuie urmată.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment”, *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors”, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone”, *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.
- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus*

## ▼ M6

- aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka”, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*”, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P. (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Nordic Council of Ministers, TemaNord* 2001:597, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3”, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*”, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.
- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations”, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.

## ▼ M6

- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)”, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations”, *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)”, *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Chapter C.14 of this Annex, Fish Juvenile Growth Test.
- (35) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Chapter C.37 of this Annex, 21-Day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*” *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

**▼ M6***Apendicele 1***Abrevieri și definiții**

**Parametrii studiați apicali:** care cauzează efecte la nivelul populației

**ASV:** Valoarea de saturație din aer (*Air saturation value*)

**Biomarker:** Care cauzează efecte la nivel individual

**Substanța chimică:** o substanță sau un amestec.

**Dph:** Zile de la eclozare (*Days post hatch*)

**DMY:** Gena domeniului DM Y-specifică necesară pentru dezvoltarea masculilor din specia *Oryzias latipes*

**ELISA:** Test de imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic

**Greutate pește:** Greutatea umedă peștilor (uscați prin tamponare)

**FSDT:** Test de dezvoltare sexuală a peștilor (*Fish Sexual Development Test*)

**Axul HPG:** Axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

**Pești hermafrodiți:** Pești care prezintă mai multe ovocite în testicul pe 6 secțiuni analizate sau celule spermatogenetice în ovare (da/nu)

**Rate de încărcare:** Greutatea umedă a unui pește per volum de apă

**MOA:** Mod de acțiune

**RT-PCR:** Reacție de polimerizare în lanț a revers transcriptazei

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

**Pești nediferențiați:** Pești cu gonade care nu prezintă celulele germinale vizibile.

**VTG:** Vitelogenină



## ▼ M6

## Apendicele 2

## Condiții experimentale pentru FSDT (specii de apă dulce)

|   |       |   |   |  |
|---|-------|---|---|--|
| 1. Specii mandate                                     | reco- | <i>Oryzias latipes</i>  | Peștele-zebră ( <i>Danio rerio</i> )  | Ghidrinul ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )  |
| 2. Tipul de test                                      |       | Flux continuu sau semistatic  | Flux continuu sau semistatic  | Flux continuu sau semistatic   |
| 3. Temperatura apei                                   |       | 25 ± 2 °C   | 27 ± 2 °C   | 20 ± 2 °C  |
| 4. Calitatea luminii                                  |       | Becuri fluorescente (spectru larg)  | Becuri fluorescente (spectru larg)  | Becuri fluorescente (spectru larg)   |
| 5. Intensitatea luminii                               |       | 10-20 μE/m <sup>2</sup> /s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)                               | 10-20 μE/m <sup>2</sup> /s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)   | 10-20 μE/m <sup>2</sup> /s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)                                      |
| 6. Perioadă expunere la lumină                        | de    | 12-16 h de lumină, 8-12 h de întuneric  | 12-16 h de lumină, 8-12 h de întuneric  | 16 h de lumină, 8 h de întuneric   |
| 7. Dimensiunea minimă a camerelor de testare          |       | Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l  | Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l  | Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l   |
| 8. Schimburile volumice ale soluțiilor de testare     |       | Minimum 5/zi  | Minimum 5/zi  | Minimum 5/zi   |
| 9. Vârsta organismelor testate la începutul expunerii | orga- | Ouă recent fertilizate (stadiul de blastulă timpurie)   | Ouă recent fertilizate (stadiul de blastulă timpurie)   | Ouă recent fertilizate   |
| 10. Numărul de ouă per tratament                      |       | Minimum 120   | Minimum 120   | Minimum 120  |
| 11. Numărul de tratamente                             |       | Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)  | Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)  | Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)   |
| 12. Numărul replici per tratament                     | de    | Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)   | Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)   | Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)  |
| 13. Regimul hrănire                                   | de    | Artemia vii, creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi. | Hrană specială pentru pești tineri, <i>Artemia</i> , creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi. | <i>Artemia</i> vii, creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi. |
| 14. Aerarea   |       | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 60 % din saturație                                       | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 60 % din saturație   | Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 70 % din saturație  |



▼ **M6**

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| 15. Apa de diluție  | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită  | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită  | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită  |
| 16. Durata expunerii la substanța chimică testată                                       | 60-dph   | 60-dph   | 60-dph   |
| 17. Parametri biologici studiați  | Succesul eclozării, supraviețuire, morfologie macroscopică, VTG histologia gonadală, sexul genetic, raportul sexelor | Succesul eclozării, supraviețuire Morfologie macroscopică, VTG histologie gonadală, raportul sexelor | Succesul eclozării, supraviețuire Morfologie macroscopică, VTG histologie gonadală, raportul sexelor |
| 18. Criteriile de acceptabilitate a testului pentru replicile comasate ale controalelor | Succesul eclozării > 80 %  | Succesul eclozării > 80 %  | Succesul eclozării > 80 %  |
|   | Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %   | Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %   | Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %   |
|   | creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 150 mg  | creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 75 mg                                   | creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 120 mg                                  |
|   | Lungime (lungime standard) > 20mm  | Lungime (lungime standard) > 14 mm   | Lungime (lungime standard) > 20 mm   |
|   | Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %  | Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %  | Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %  |

▼ **M6***Apendicele 3***Caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile**

| CONSTITUENT   | CONCENTRAȚIE |
|---|--------------|
| Materie sub formă de particule                              | < 20 mg/l    |
| Carbon organic total  | < 2 mg/l     |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l     |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l    |
| Total pesticide organofosforice                             | < 50 ng/l    |
| Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l    |
| Clor organic total  | < 25 ng/l    |

▼ **M6***Apendicele 4***Din metoda de testare C.14/Orientări privind concentrațiile de testare**

| Coloană (numărul de concentrații între 100 și 10, sau între 10 și 1) (*) |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |
| 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32   | 46  | 56  | 63  | 68  | 72  | 75  |
| 10   | 22  | 32  | 40  | 46  | 52  | 56  |
| 3,2  | 10  | 18  | 25  | 32  | 37  | 42  |
| 1  | 4,6 | 10  | 16  | 22  | 27  | 32  |
|  | 2,2 | 5,6 | 10  | 15  | 19  | 24  |
|  | 1   | 3,2 | 6,3 | 10  | 14  | 18  |
|  |     | 1,8 | 4   | 6,8 | 10  | 13  |
|  |     | 1   | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10  |
|  |     |     | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
|  |     |     | 1   | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
|  |     |     |     | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
|  |     |     |     | 1   | 1,9 | 3,2 |
|  |     |     |     |     | 1,4 | 2,4 |
|  |     |     |     |     | 1   | 1,8 |
|  |     |     |     |     |     | 1,3 |
|  |     |     |     |     |     | 1   |

(\*) Dintr-o coloană poate fi aleasă o serie de trei (sau mai multe) concentrații succesive. Punctele de mijloc dintre concentrațiile din coloana (x) se găsesc în coloana (2x + 1). Valorile enumerate pot să reprezinte concentrații exprimate ca procent per volum sau greutate (mg/l sau µg/l). Valorile pot fi înmulțite sau împărțite cu orice putere a lui 10, după caz. Coloana 1 poate fi folosită dacă există o incertitudine semnificativă asupra nivelului de toxicitate.

▼ **M6***Apendicele 5***Orientări privind omogenizarea capului și a cozii la exemplarele tinere din speciile pește-zebră, *Pimephales promelas*, ghidrin și *Oryzias latipes***

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile care au loc înainte de cuantificarea concentrației VTG. Pot fi utilizate alte proceduri care conduc la cuantificarea comparabilă a VTG. Determinarea concentrației de VTG în plasma sanguină sau ficat în loc de omogenatul din cap/coadă este o opțiune.

**Procedură**

1. Peștii sunt anesteziați și eutanasiați conform descrierii testului.
2. Capul și coada peștelui sunt tăiate conform descrierii testului. **Important:** Toate instrumentele de disecție și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu VTG” de la femele sau de la masculii la care aceasta a fost indusă la masculii la care nu a fost indusă.
3. Greutatea ansamblului cap-coadă al fiecărui pește este măsurată la cel mai apropiat mg.
4. După cântărire, părțile sunt introduse în eprubete corespunzătoare (de exemplu, Eppendorf de 1,5 ml) și congelate la o temperatură de – 80 °C până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață și rezultatul este o masă omogenă). **Important:** *Eprubetele trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de corp corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor.*
5. Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă o cantitate de **tampon de omogenizare (\*)** înghețat reprezentând de 4 – 10 ori greutatea țesutului (a se nota diluția). Se continuă operațiunea cu pistilurile până ce amestecurile devin omogene. **Notă importantă:** *Se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.*
6. Eșantioanele sunt așezate pe gheață până în momentul centrifugării la o temperatură de 4 °C și la 50 000 g timp de 30 de minute.
7. Se utilizează o pipetă pentru a repartiza părți de 20 – 50 μl (a se nota cantitatea) de supernatant în **cel puțin două** eprubete introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără fracțiuni de grăsime sau de granule.
8. Eprubetele sunt depozitate la o temperatură de – 80 °C până în momentul utilizării.

**(\*) Tampon de omogenizare:**

50 mM de Tris-HCl cu pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma): 12 ml Tris-HCl cu pH 7,4 + 120 μl amestec de inhibitori de protează (sau amestecuri de inhibitori de protează echivalente).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Amestec de inhibitori de protează: De la Sigma (pentru țesut de mamifer)  
Numărul produsului **P 8340**.

**Notă:** Tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării

## ▼ M6

## Apendicele 6

**Orientări privind cuantificarea vitelogeninei din omogenatul din cap și coadă la peștele-zebră (*Danio rerio*) (modificat după Holbech et al., 2001).  
pot fi utilizate alte proceduri care utilizează anticorpi și standarde omoloage**

1. Plăci de microtitrare (certIFICATE Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Danemarca) acoperite în prealabil cu 5  $\mu$  g/ml IgG antilipovitelină de pește-zebră sunt decongelate și spălate de 3 ori cu tampon de spălare (\*).
2. Standardul de vitelogenină de pește-zebră purificat <sup>(1)</sup> este diluat în serie la 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 și 20 ng/ml în tampon de diluare (\*\*), iar eșantioanele sunt diluate de cel puțin de 200 ori (pentru a preveni efectul de matrice) în tampon de diluare și sunt aplicate pe plăci. Un control al testului este aplicat în duplicat. 150  $\mu$ l se aplică în fiecare godeu. Standardele sunt aplicate în duplicat, iar eșantioanele în triplicat. Se lasă la incubat pe timpul nopții la 4 °C pe un agitator.
3. Plăcile sunt spălate de 5 ori cu tampon de spălare (\*)
4. HRP cuplat la un lanț dextran (de exemplu, AMDEX A/S, Danemarca) și anticorpi conjugați se diluează în tamponul de spălare; diluarea efectivă diferă în funcție de lot și de vârstă. 150  $\mu$ l se aplică în fiecare godeu, iar plăcile sunt incubate timp de 1 oră la temperatura camerei pe un agitator.
5. Plăcile sunt spălate de 5 ori cu tampon de spălare (\*), iar partea de jos a plăcilor este curățată cu grijă cu etanol.
6. 150  $\mu$ l TMB plus (\*\*\*) se aplică în fiecare godeu. Se protejează placa împotriva luminii cu staniol și se urmărește apariția culorii pe un agitator.
7. Atunci când curba standard este pe deplin dezvoltată, activitatea enzimei este oprită prin adăugarea a 150  $\mu$ l 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> în fiecare godeu.
8. Absorbanța este măsurată la 450 nm (de exemplu, pe un cititor de plăci Molecular Devices Thermomax). Datele sunt analizate pe software-ul asociat (de exemplu, Softmax).

(\*) Tampon de spălare:

|                 |     |    |
|-----------------|-----|----|
| stoc PBS (****) | 500 | ml |
| BSA             | 5   | g  |
| Tween 20        | 5   | ml |

Se ajustează pH-ul la 7,3 și se umple până la 5 l cu H<sub>2</sub>O millipore. Se depozitează la 4 °C.

(\*\*) Tampon de diluție:

|                 |     |    |
|-----------------|-----|----|
| Stoc PBS (****) | 100 | ml |
| BSA             | 3   | g  |
| Tween 20        | 1   | ml |

Se ajustează pH-ul la 7,3 și se umple până la 1 l cu H<sub>2</sub>O millipore. Se depozitează la 4 °C.

(\*\*\*) TMB plus este un substrat „gata de utilizare” produs de KemEnTec (Danemarca). Este sensibil la lumină. Se depozitează la 4 °C.

<sup>(1)</sup> Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), purificare conform: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

**▼ M6**

(\*\*\*\*) Stoc PBS

|   |      |   |
|---|------|---|
| NaCl  | 160  | g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 4    | g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 26,6 | g |
| KCl   | 4    | g |

*Se ajustează pH-ul la 6,8 și se umple cu H<sub>2</sub>O millipore până la 2 l. Se depozitează la temperatura camerei.*

▼ **M6***Apendicele 7***Orientări privind pregătirea secțiunilor tisulare pentru determinarea sexului și stadializarea gonadelor**

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile care au loc înainte de evaluarea secțiunilor histologice. Pot fi utilizate și alte proceduri care au ca rezultat o determinare a sexului și stadializarea gonadală similare.

Cu câteva excepții, aceste proceduri sunt similare pentru *Oryzias latipes* (Japanese medaka – JMD) și peștele-zebră (zebrafish – ZF).

**Eutanasierea, necropsia și fixarea tisulară***Obiective:*

1. Peștele este eutanasiat.
2. Se obține greutatea și se efectuează măsurătorile necesare.
3. Se evaluează caracteristicile sexuale secundare.
4. Țesuturile sunt disecate pentru analiza VTG.
5. Se fixează gonadele.

*Proceduri:*

1. Peștele trebuie sacrificat imediat înainte de necropsie. Prin urmare, cu excepția cazului în care sunt disponibile mai multe persoane pentru a efectua disecții, peștii nu trebuie să fie sacrificați simultan.
2. Folosind plase de mici dimensiuni, peștele este îndepărtat din camera experimentală și transportat în zona de necropsie în recipientul de transport.
3. Peștele este introdus în soluția de eutanasiere. Peștele este îndepărtat din soluție atunci când peștele încetează să respire și să răspundă la stimuli externi.
4. Peștele este cântărit umed.
5. Pentru pregătirea țesuturilor pentru analiza VTG, peștele poate fi plasat pe o placă de plută a unui microscop de disecție.
  - a. Pentru peștele-zebră, capul este tăiat chiar în spatele înotătoarei pectorale, iar coada este tăiată chiar în spatele înotătoarei dorsale.
  - b. Pentru *Oryzias latipes*, abdomenul este deschis printr-o incizie efectuată cu grijă, care se extinde de-a lungul liniei mediane ventrale de la centura pectorală la un punct situat imediat cranial față de anus. Cu ajutorul forcepsului fin și a unei foarfeci mici, ficatul este îndepărtat cu grijă.
6. Eșantionul pentru analiza VTG este plasat în tuburi Eppendorf și congelat imediat în azot lichid.
7. Carcasa care include gonadele este introdusă într-o casetă din plastic pentru țesut preetichetată, care este transferată într-un fixator Davidson sau Bouin. Volumul fixatorului trebuie să fie de cel puțin 10 de ori mai mare ca volumul aproximativ al țesuturilor. Recipientul fixator este agitat ușor timp de cinci secunde pentru dislocarea bulelor de aer din casetă.
8. a. Toate țesuturile rămân în timpul nopții în fixatorul Davidson, a doua zi fiind transferate în recipiente individuale conținând formol 10 % tamponat neutru. Recipientele cu casete sunt agitate ușor timp de 5 secunde pentru a asigura penetrarea adecvată a formolului în casete.

**▼ M6**

- b. Țesuturile rămân în fixatorul Bouin timp de 24 de ore, fiind transferate în etanol 70 %.

**Procesarea țesuturilor***Obiective:*

1. Se deshidratează țesutul pentru penetrarea adecvată a parafinei.
2. Se impregnează țesutul cu parafină pentru a menține integritatea țesuturilor și pentru a crea o suprafață fermă pentru microtomie.

*Proceduri:*

3. Casetele de țesut etichetate sunt îndepărtate din mediul de stocare cu formol/ etanol și sunt introduse în coșul (coșurile) de procesare. Coșul de procesare este încărcat în procesatorul tisular.
4. Se selectează calendarul de procesare.
5. După ce procesatorul tisular a finalizat ciclul de procesare, coșul (coșurile) poate (pot) fi transferat(e) în stația integrată.

**Integrare***Obiectiv:*

Orientarea corectă a eșantionului în parafină solidificată pentru microtomie.

*Proceduri:*

1. Coșul (coșurile) de casete este (sunt) îndepărtat(e) din procesator și este (sunt) scufundat(e) în camera frontală umplută cu parafină a consolei termice a stației de integrare sau casetele sunt mutate într-un încălzitor de parafină separat.
2. Prima casetă care urmează să fie integrată este îndepărtată din camera frontală a consolei termice sau din încălzitorul de parafină. Capacul casetei este îndepărtat și eliminat, iar eticheta casetei este verificată în ceea ce privește înregistrările privind animalul pentru a soluționa potențialele discrepanțe înainte de integrare.
3. Se alege o matriță de dimensiuni corespunzătoare pentru integrare.
4. Matrița este ținută sub duza consolei de distribuire și umplută cu parafină topită.
5. Eșantionul este îndepărtat din casetă și introdus în parafina topită din matriță. Această operațiune se repetă cu 4 – 8 eșantioane pentru fiecare matriță cu parafină. Poziția fiecărui pește este marcată prin plasarea peștelui nr. 1 la 180 de grade față de peștii 2-4/8.
6. Se adaugă parafină suplimentară pentru a acoperi eșantionul.
7. Matrița și baza casetei se plasează pe placa de răcire a crioconsolei.
8. După ce parafina s-a solidificat, blocul (adică, parafina întărită care conține țesuturile și baza casetei) este îndepărtată din matriță

**Microtomie***Obiectiv:*

Se taie și se montează secțiunile histologice pentru colorare.

*Proceduri:*

1. Faza inițială a microtomiei, denumită „facing” se desfășoară astfel:
  - a. Blocul de parafină este plasat în mandrina microtomului.
  - b. Mandrina este avansată prin rotirea roții microtomului, iar secțiuni groase sunt tăiate de la suprafața blocului de parafină până când cuțitul ajunge la țesuturile integrate.



**▼ M6**

- c. Grosimea secțiunii pe microtom este stabilită la 3 – 5 microni. Mandrina este avansată și din bloc se taie secțiuni multiple pentru a se elimina orice artefacte create pe suprafața tăiată a țesutului în cursul tăierii grosiere.
  - d. Blocul poate fi îndepărtat din mandrină și plasat cu fața în jos pe gheață pentru înmuierea țesutului.
2. Următoarea fază a microtomiei este secționarea finală și montarea secțiunilor de țesut pe lame. Aceste proceduri sunt efectuate după cum urmează:
- a. Dacă blocul a fost plasat pe gheață, el este îndepărtat de pe gheață și înlocuit în mandrină microtomului.
  - b. În condițiile în care grosimea secțiunilor de pe microtom este fixată la 3 – 5 microni, mandrina este avansată prin rotirea roții microtomului. Secțiunile sunt tăiate din bloc până când se obține o „panglică” care conține cel puțin o secțiune acceptabilă care include gonade. (În măsura în care este necesar în timpul secționării, blocul poate fi îndepărtat din mandrină, plasat pe gheață pentru a înmuia țesutul și apoi înlocuit în mandrină.)
  - c. Secțiunile plutesc la suprafața apei din baia de apă. Se încearcă să se obțină cel puțin o secțiune care nu conține nici încrețituri și nici bule de aer.
  - d. O lamă de microscop este introdusă sub cea mai bună secțiune, care este ridicată din apă cu ajutorul lamei. Acest proces este denumit „montarea” secțiunii pe lamă.
  - e. Pentru un set de pești sunt pregătite trei secțiuni. A doua și a treia secțiune sunt tăiate la intervale de 50 de microni de la prima secțiune. Dacă peștele nu este integrat cu gonadele sale în același nivel de secționare, se vor realiza mai multe secțiuni pentru a se asigura că de la fiecare pește sunt obținute cel puțin șase secțiuni care să includă gonadele.
  - f. Cu un pix de marcarea lamei, numărul blocului din care a fost produsă lama este înregistrat pe lamă.
  - g. Lama este plasată pe un suport de colorare.
  - h. Blocul este îndepărtat din mandrină și plasat cu fața în jos pentru depozitare.

**Colorarea, aplicarea lamelelor și marcarea lamelor***Obiective:*

- Se colorează secțiunile pentru examenul histopatologic.
- Se sigilează permanent țesuturile montate și colorate.
- Se identifică permanent secțiunile colorate într-un mod care să permită o trasabilitate completă.

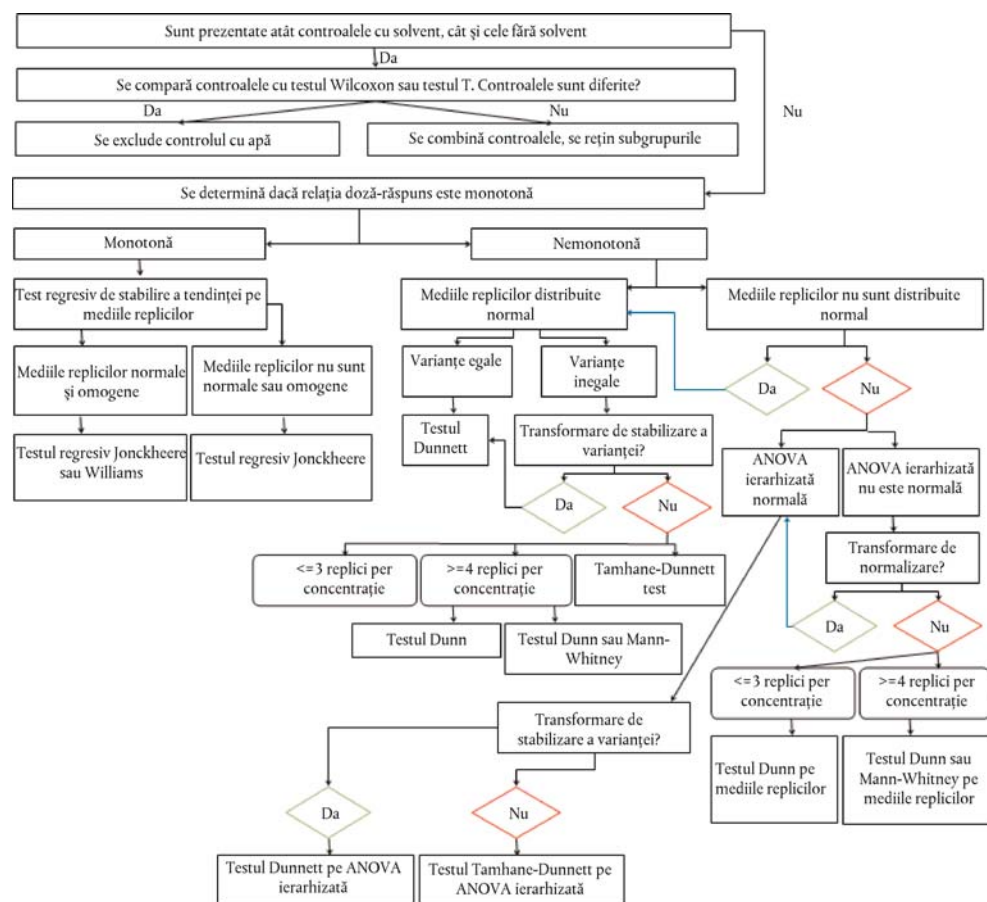
*Proceduri:*

1. Colorare
  - a. Lamele se lasă să se usuce la aer peste noapte înainte de colorare.
  - b. Secțiunile sunt colorate cu hematoxină-eozină.
2. Aplicarea lamelelor
  - a. Lamelele pot fi aplicate manual sau automat.
  - b. O lamă se scufundă în xilen sau în TissueClear, iar excesul de xilen/TissueClear este îndepărtat ușor de pe lamă.

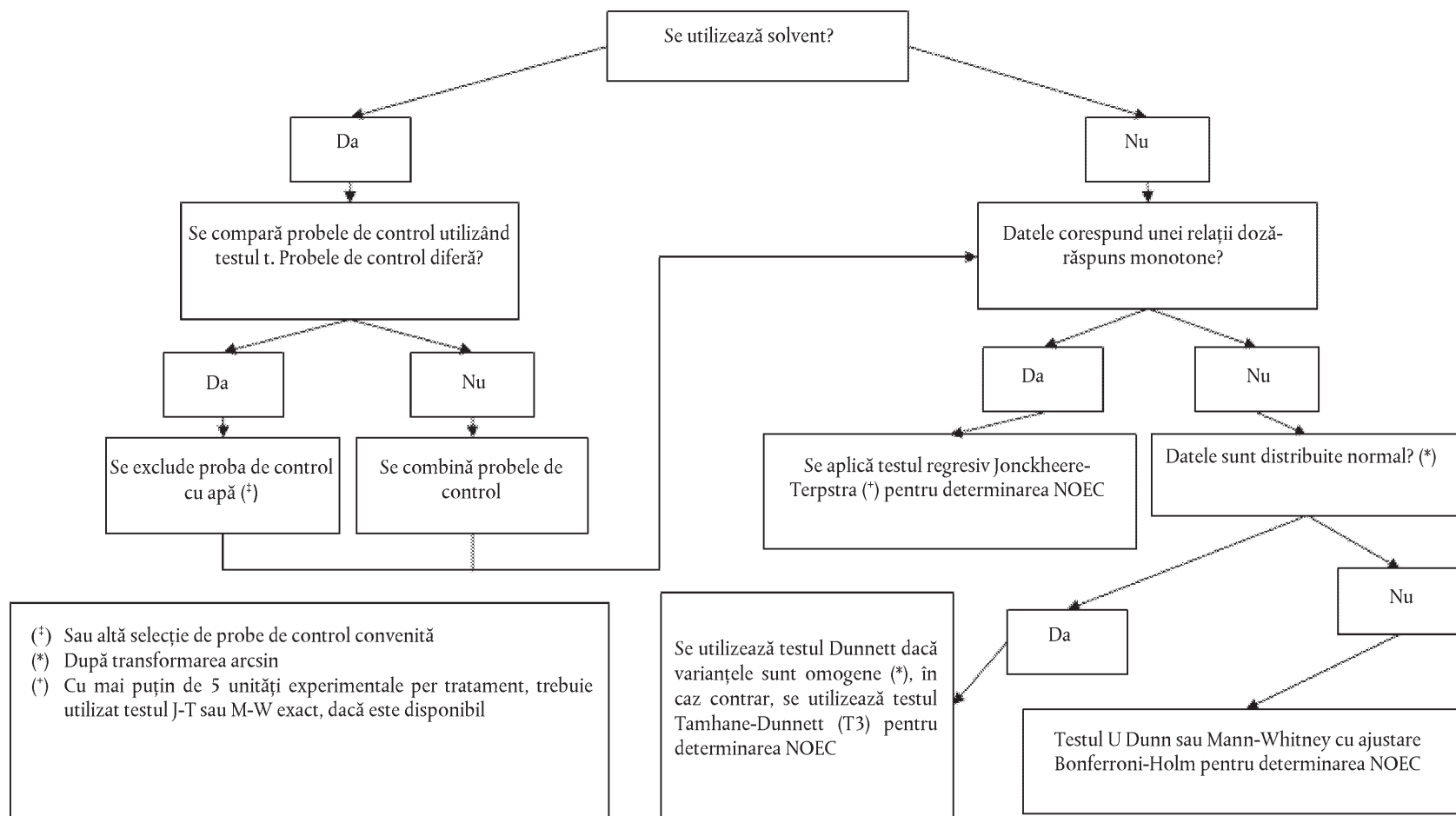
**▼M6**

- c. Aproximativ 0,1 ml de mediu de montare se aplică aproape de capătul lamei, opus capătului congelat sau pe lamelă.
  - d. Se aplică lamela pe lamă înclinând-o ușor.
- 3. Etichetarea
  - a. Eticheta de pe fiecare lamă trebuie să includă următoarele informații:
    - i. Denumirea laboratorului
    - ii. Specia
    - iii. Eșantion nr. / Lama nr.
    - iv. Substanța chimică/grupul de tratament
    - v. Data

## Organigramă statistică pentru analiza vitelogeninei



## Organigramă statistică pentru analiza raportului sexelor



▼ **M6***Apendicele 9***Orientări privind prelevarea de țesut pentru determinarea sexului genetic și pentru determinarea sexului genetic prin metoda PCR****Prelevarea de țesut, pregătirea și depozitarea înainte de determinarea sexului genetic prin metoda PCR la *Oryzias latipes* (pregătită de Laboratorul pentru organisme acvatice al Bayer CropScience AG)**

1. Cu ajutorul unor foarfeci fine se taie înotătoarea anală sau dorsală a fiecărui pește individual și se plasează într-o eprubetă umplută cu 100μl de tampon de extracție 1 (pentru detalii privind prepararea tamponului, a se vedea mai jos). Foarfecele vor fi curățate după fiecare pește individual într-un pahar de laborator umplut cu H<sub>2</sub>O distilată și uscate cu un șervet de hârtie.
2. Țesuturile de la înotătoare vor fi omogenizate cu un pistil de teflon într-o microeprubetă pentru liza celulelor. Pentru fiecare eprubetă va fi utilizat un nou pistil pentru a preveni orice contaminare. Pistilurile vor fi plasate peste noapte în 0,5 M NaOH, clătite timp de 5 minute în H<sub>2</sub>O distilată și depozitate în etanol sau în apă sterilă după autoclavare, până la utilizare.
3. De asemenea, este posibil ca țesutul de la înotătoare să fie depozitat fără ajutorul unui tampon de extracție 1 pe dioxid de carbon solid și apoi într-un congelator la o temperatură de – 80 °C pentru a preveni orice degenerare a ADN-ului. Dar extragerea se realizează mai bine dacă se extrage ADN-ul în același timp (pentru manipulare, a se vedea mai sus; eșantioanele trebuie decongelate pe gheață după depozitare – 80 °C înainte ca tamponul să fie vărsat eprubete).
4. După omogenizare, toate eprubetele vor fi plasate într-o baie de apă și se fierb timp de 15 minute la 100 °C.
5. Apoi, 100 μl din tampon de extracție 2 (pentru detalii privind prepararea tamponului, a se vedea mai jos) vor fi pipetați în fiecare eprubetă. Eșantioanele vor fi depozitate la temperatura camerei timp de 15 minute și, între timp, vor fi agitate ușor, din când în când, manual.
6. Apoi, toate eprubetele vor fi plasate din nou în baia de apă și se fierb timp de încă 15 minute la 100 °C.
7. Până la o analiză suplimentară eprubetele vor fi congelate la – 20 °C.

**Prepararea tamponului**

Tamponul 1 pentru PCR:

500 mg N-lauroilsarcosina (de exemplu, Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

se adaugă 100 ml apă distilată H<sub>2</sub>O

→ autoclavare

Tamponul 2 pentru PCR:

20 g Chelex (e.g. Biorad, Munich, GE)

Se umflă în 100 ml apă distilată H<sub>2</sub>O

→ autoclavare

**Determinarea sexului genetic (prin metoda PCR) la *Oryzias latipes* (pregătită de Laboratorul pentru organisme acvatice al Bayer CropScience AG și de Universitt Würzburg Biozentrum)**

Eprubetele pregătite și congelate (descrise în secțiunea de mai sus) vor fi decongelate pe gheață. Apoi, ele vor fi centrifugate folosind o centrifugă Eppendorf (30 de secunde la viteză maximă, la temperatura camerei). Pentru PCR, se va folosi supernatantul clar separat de precipitat. Trebuie să se evite cu orice preț ca orice urmă de Chelex (localizată în precipitat) să fie transferată la reacția PCR, deoarece aceasta va interfera cu activitatea polimerazei „Taq”. Supernatantul va fi utilizat direct sau poate fi depozitat congelat (la – 20 °C) și redecongelat în mai multe cicluri fără un impact negativ asupra ADN-ului, pentru analize ulterioare.

▼ **M6**

## 1. Pregătirea „amestecului de reacție” (25 µl per eşantion):

|   | Volum         | Concentrație finală |
|---|---------------|---------------------|
| Model de ADN  | 0,5µl – 2µl   |                     |
| 10 x tampon PCR cu MgCl <sub>2</sub>  | 2,5µl         | 1x                  |
| Nucleotide (fiecare dintre dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  | 4µl (5mM)     | 200 µM              |
| Primer sens (10 µM) (a se vedea mai jos 3 – 5)  | 0,5µl         | 200 nM              |
| Primer antisens (10 µM) (a se vedea mai jos 3 – 5)  | 0,5µl         | 200 nM              |
| DMSO  | 1,25 µl       | 5 %                 |
| Apă (calitate PCR)  | până la 25 µl |                     |
| Polimerază Taq E  | 0,3 µl        | 1,5 U               |
| 10 x tampon PCR cu MgCl <sub>2</sub> : 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 la 25 °C), 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20 |               |                     |

Pentru fiecare PCR (a se vedea mai jos 3 – 5) este necesar primerul special ca o nouă combinație de „amestec de reacție” și cantitatea adecvată necesară pentru modelul de ADN pentru fiecare eşantion (a se vedea mai sus). Volumele respective vor fi transferat în eprubete noi, folosind pipete. Ulterior, toate eprubetele vor fi închise și agitate (aproximativ 10 secunde) și centrifugate (10 secunde la temperatura camerei). Acum respectivele programe PCR pot fi pornite. În plus, un control pozitiv (eşantion de ADN exemplar cu activitate cunoscută și rezultate clare) și un control negativ (1 µl H<sub>2</sub>O distilată) vor fi utilizate în fiecare program PCR.

## 2. Prepararea gelului de agaroză (1 %) – Pe durata funcționării programelor PCR:

- Se dizolvă 3 g agaroză în 300 ml 1 × tampon TAE (1 % gel de agaroză).
- Această soluție trebuie fiartă într-un cuptor cu microunde (aproximativ 2 – 3 minute).
- Se transferă soluția fierbinte într-o cutie specială de turnare, care este așezată pe gheață.
- După aproximativ 20 de minute, gelul de agaroză este gata de utilizare.
- Se depozitează gelul de agaroză în 1 × tampon TAE până la sfârșitul programelor PCR.

## 3. Programul PCR pentru actină:

Această reacție PCR are ca scop să demonstreze că ADN-ul din eşantion nu este deteriorat.

- Primer special:

„Mact1(sus/sens)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(jos/antisens)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (35 de ori):

Denaturare → 45 sec la 95 °C

Atașarea primerului → 45 sec la 56 °C

Elongare → 1 min la 68 °C

15 min la 68 °C

▼ **M6**4. *Programul PCR pentru genele X și Y*

Probele cu ADN intact vor fi utilizate în acest program PCR pentru a detecta genele X și Y. ADN-ul de la masculi trebuie să indice o bandă dublă, iar ADN-ul de la femele trebuie să indice o singură bandă (după colorare și electroforeză în gel). Pentru acest program trebuie inclus un control pozitiv pentru masculi (eșantion XY) și unul pentru femele (eșantion XX).

— Primer special:

„PG 17.5” (sus/sens) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (jos/antisens) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (40 de ori):

Denaturare → 45 sec la 95 °C

Atașarea primerului → 45 sec la 55 °C

Elongare → 1 min 30 sec la 68 °C

15 min la 68 °C

5. *Program PCR pentru gena Y drept „control” pentru X și program PCR pentru genele X și Y:*

Acest program PCR verifică rezultatele „programului PCR pentru genele X și Y”. „Eșantioanele-mascul” trebuie să prezinte o bandă, iar „eșantioanele-femelă” nu trebuie să prezintă nicio bandă (după colorare și electroforeză în gel).

— Primer special:

„DMTYa (sus/sens)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (jos/antisens)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (40 de ori):

Denaturare → 45 sec la 95 °C

Atașarea primerului → 45 sec la 56 °C

Elongare → 1 min la 68 °C

15 min la 68 °C

6. *Colorarea eșantioanelor PCR:*

Soluție pentru colorare:

50 % glicerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Albastru de bromfenol

0,25 % xilencianol

Se pipetează 1 μl de soluție de colorare în fiecare eprubetă în parte

7. *Începerea electroforezei în gel:*

— Gelul de agaroză 1 % preparat va fi transferat într-o cameră pentru electroforeză în gel umplută cu 1 × tampon TAE

— 10 – 15 μl din fiecare eșantion PCR colorat vor fi pipetați într-un godeu de gel de agaroză

— De asemenea, 5 – 15 μl din 1kb-„Ladder”(Invitrogen) vor fi pipetați într-un godeu separat

— Se începe electroforeza cu 200 V

— Se oprește după 30 – 45 de minute

**▼ M6***8. Determinarea benzilor:*

- Se curăță gelul de agaroză în H<sub>2</sub>O distilată
- În continuare, se transferă gelul de agaroză în bromură de etidiu timp de 15 – 30 minute
- Apoi se fotografiază gelul de agaroză într-o cutie cu UV
- În final, eşantioanele se analizează în comparație cu banda (benzile) controlului pozitiv și scara



▼ **M6***Apendicele 10***Orientări privind prelevarea de țesut pentru determinarea sexului genetic prin metoda PCR la ghidrin****Prelevarea de țesut și extracția ADN-ului**

ADN-ul poate fi extras utilizând o varietate de reactivi disponibili comercial și sisteme manuale și automate de extracție. Protocolul utilizat în laboratorul Cefas Weymouth este indicat mai jos și au fost adăugate metode alternative acolo unde a fost cazul.

1. Cu ajutorul unor foarfece fine, se prelevă o bucată mică de țesut (10 – 20 mg) din zona dorsolaterală (după înlăturarea capului și a cozii pentru analiza VTG) de la fiecare pește. Țesutul se adaugă într-o eprubetă și fie este plasat direct în azot lichid (pentru depozitare la – 80 °C), fie umplut cu etanol 70 % (pentru transport și depozitare ulterioară la 4 °C). Foarfecele sunt curățate după fiecare pește în parte în etanol 70 %, apoi în apă distilată și se usucă cu hârtie absorbantă.
2. Etanolul (dacă este prezent) este îndepărtat prin aspirare, iar țesutul este digerat peste noapte cu proteinaza K în 400 μl de tampon ATL (Qiagen). O alicotă (200 μl) de soluție de digestie este transferată într-un bloc S cu 96 de godeuri (Qiagen), iar ADN-ul este extras într-o structură cu 96 de godeuri folosind Qiagen Universal BioRobot și kitul QIamp Investigator BioRobot. ADN-ul este eluat în 50 μl de apă fără DNază și RNază. Dacă se folosesc țesuturi dure pentru a extrage ADN-ul (precum coloana vertebrală sau o înotătoare pectorală), poate fi necesar să se omogenizeze eșantionul în tampon pentru liză cu ajutorul unui produs de liză tisulară FastPrep® sau al unui sistem echivalent de liză tisulară.

În mod alternativ,

- (a) țesutul este digerat peste noapte cu proteinază K în 400 μl de tampon de liză G2 (Qiagen) și se extrage ADN-ul din 200 μl de țesut digerat utilizând fie kit-ul tisular ușor ADN EZ-1 și biorobotul EZ-1, fie minikit-ul tisular ușor ADN. ADN-ul este eluat într-un volum de 50 μl.
- (b) Țesuturile sunt procesate utilizând reactivul DNAzol. Rezumând, eșantioanele de țesut sunt lizate în 1 ml de DNAzol timp de 10 minute într-o eprubetă de microcentrifugă de 1,5 ml și apoi centrifugate la 13 000 rpm timp de 5 minute pentru a îndepărta orice materie sub formă de particule. Eșantionul lizat este apoi transferat într-o nouă eprubetă de microcentrifugă de 1,5 ml care conține 500 μl de etanol 100 % de grad molecular și apoi centrifugat la 13 000 rpm timp de 10 minute pentru a precipita ADN-ul. Etanolul este îndepărtat și înlocuit cu 400 μl de etanol 70 % de grad molecular, centrifugat la 13 000 rpm timp de 5 minute, iar granulele de ADN sunt dizolvate în 50 μl de apă fără DNază și RNază moleculară. Din nou, atunci când se utilizează țesuturi dure (înotătoare pectorală), poate fi necesar să se omogenizeze eșantionul în tamponul pentru liză cu ajutorul unui produs de liză tisulară FastPrep® sau al unui sistem echivalent de liză tisulară înainte de extragerea ADN-ului.

3. ADN-ul se păstrează la temperatura de – 20 °C, până în momentul utilizării.

*Notă importantă:* în cursul procedurilor este obligatorie purtarea mănușilor.

**Testarea prin reacția în lanț a polimerazei (PCR)**

Amplificările au fost efectuate utilizând 2,5 μl de extract de ADN într-un volum de reacție de 50 μl utilizând primeri de locus Idh (astfel cum a fost descris de Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

|                 |                                   |
|-----------------|-----------------------------------|
| Primer sens     | 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3' |
| Primer antisens | 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'  |

▼ **M6**

Există numeroși furnizori de reactivi PCR corespunzători. Metoda descrisă mai jos este cea utilizată în prezent în laboratorul Cefas Weymouth.

1. *Pregătirea „amestecului de reacție” (50 µl per eșantion):*

Se prepară un amestec principal după cum urmează: Acesta poate fi pregătit în prealabil și păstrat în stare congelată la – 20 °C până în momentul utilizării. Amestecul principal trebuie să fie pregătit într-o cantitate suficientă pentru un control negativ (numai apă de calitate pentru biologie moleculară).

|  | Volum (conc. stoc)/<br>eșantion | Concentrație finală |
|--|---------------------------------|---------------------|
| Tampon de reacție 5xGoTaq®                 | 10µl                            | 1x                  |
| MgCl <sub>2</sub>                          | 5 µl (25 mM)                    | 2,5 mM              |
| Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)        | 0,5 µl (25 mM fiecare)          | 250 µM fiecare      |
| Primer sens                                | 0,5µl (0,1 nmol/µl)             | 2 µM                |
| Primer antisens                            | 0,5µl (0,1 nmol/µl)             | 2 µM                |
| Apă de calitate pentru biologie moleculară | 30,75 µl                        |                     |
| Polimerază GoTaq                           | 0,25 µl                         | 1,25 U              |

— Se introduce 47,5 µl într-o eprubetă cu pereți subțiri de 0,5 ml pentru PCR.

— Se adaugă 2,5 µl de ADN purificat în eprubeta marcată corespunzător. Procedura se repetă pentru toate eșantioanele și pentru controlul negativ.

— Se adaugă deasupra 2 picături de ulei mineral. În mod alternativ, se utilizează un aparat de ciclizare termică cu capac încălzit.

— Se închid capacele.

— Eșantioanele au fost denaturate într-un aparat de ciclizare termică Peltier PTC-225 la 94 ± 2 °C timp de 5 minute, urmată de 39 de cicluri la 94 ± 2 °C timp de 1 minut, 55 ± 2 °C timp de 1 minut, 72 ± 2 °C timp de 1 minut și o extensie finală la 72 ± 2 °C timp de 10 minute.

2. *Prepararea gelului de agaroză (2 %):*

În mod tradițional, produsele PCR sunt introduse într-un gel de agaroză 20 % care conține bromură de etidiu.

Pot fi utilizate, de asemenea, sisteme de electroforeză capilare.

— Se cântăresc 2 g de agaroză în 100 ml 1 × tampon TAE

— Se încălzesc într-un cuptor cu microunde (aproximativ 2 – 3 min) pentru a dizolva agaroză.

— Se adaugă 2 picături de bromură de etidiu cu o concentrație finală de 0,5µg/ml

— Se transferă soluția fierbinte în echipamentul de formare a gelului.

— Se lasă gelul să se întărească

3. *Electroforeza în gel:*

— Gelul de agaroză este transferat în echipamentul de electroforeză și se scufundă în 1 × tampon TAE

— Se încarcă 20 µl din fiecare eșantion într-un godeu separat, adăugând un marker de greutate moleculară (scară ADN 100 bp, Promega) într-un godeu liber.

— Electroforeza se realizează la 120 V timp de 30 – 45 de minute.

**▼ M6****4. *Vizualizarea produşilor de amplificare***

Dacă bromura de etidiu a fost încorporată în gelul de agaroză astfel cum se descrie mai sus, produşii ADN sunt vizualizaţi cu o sursă de raze UV. Ca alternativă, gelul de agaroză este colorat prin acoperirea gelului cu soluţie diluată de bromură de etidiu (0,5 µg/ml în apă) timp de 30 de minute înainte de vizualizare.

▼ **M6***Apendicele 11***Orientări pentru procedura de fertilizare artificială a de ghidrinilor**

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile de obținere a ouălor fertilizate de ghidrin în vederea utilizării lor în FSDT.

**Proceduri**

Obținerea spermei de la masculi

1. Un mascul bine colorat din populația dorită este eutanasiat.
2. Testiculele sunt disecate de pe fiecare latură a peștelui. *Testiculele sunt în general structuri intens pigmentate, sub formă bastoane, care sunt ușor vizibile lateral de linia mediană a corpului.* Se utilizează una dintre următoarele metode:
3. Utilizând o pereche de foarfeci fine, se începe de la cloacă și se realizează o incizie de 1 – 1,5 cm într-o singură mișcare sub un unghi de circa 45 de grade.
4. Se folosește un bisturiu pentru realizarea unei incizii mici în părțile laterale ale peștelui ușor posterior față de pelvis și imediat ventral față de plăcile laterale.
5. Testiculele sunt îndepărtate utilizând un forceps fin și sunt plasate într-o placă Petri.
6. Fiecare testicul este acoperit cu 100 μl de **soluție finală Hank** <sup>(1)</sup> proaspăt preparată.
7. Testiculele sunt tăiate mărunț folosind o lamă de oțel sau un bisturiu. Aceasta va elibera sperma și va conferi soluției Hank un aspect lăptos.
8. Fluidul conținând spermă se adaugă într-o pipetă, încercând, în același timp, să nu se includă bucăți de țesut de testicule atunci când se pipetează.
9. 800 μl de soluție finală Hank se adaugă într-o eprubetă și se amestecă bine.
10. Dacă este necesar, masculii pot fi conservați prin fixare în etanol 100 % sau în alt fixator dorit. Aceasta este deosebit de important în cazul în care studiul atribuie originea parentală a descendenților.

**Notă importantă:** *Cu toate că majoritatea soluțiilor stoc necesare pot fi efectuate în avans, soluția stoc 5 și, ulterior, soluția finală, trebuie constituite în stare proaspătă în ziua utilizării.*

**Soluția stoc 1**

|  |        |
|--|--------|
| NaCl   | 8,00 g |
| KCl  | 0,40 g |
| Apă distilată ( <i>Distilled water</i> – DW) | 100 ml |

**Soluția stoc 2**

|  |         |
|--|---------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidru) | 0,358 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>            | 0,60 g  |
| DW   | 100 ml  |

**Soluția stoc 3**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| CaCl <sub>2</sub> | 0,72 g |
| DW                | 50 ml  |

<sup>(1)</sup> Soluție salină tamponată Hank (*Hank's Buffered Salt Solution* – HBSS):  
HBSS este necesară pentru a păstra sperma în cursul pregătirii pentru fertilizare.

**▼ M6****Soluția stoc 4**

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,23 g

DW 50 ml

**Soluția stoc 5 (proaspăt preparată)**

NaHCO<sub>3</sub> 0,35 g

DW 10 ml

*Notă:* Dacă există disponibile unele dintre sărurile de mai sus dar cu conținut de apă diferit (i.e. 2H<sub>2</sub>O în loc de anhidre) ele pot fi utilizate, dar mai întâi se ajustează greutatea pe baza greutății moleculare).

Pentru soluția finală Hank se combină în următoarea ordine:

soluția stoc 1 1 ml

soluția stoc 2 0,1 ml

soluția stoc 3 0,1 ml

DW 8,6 ml

soluția stoc 4 0,1 ml

soluția stoc 5 0,1 ml

Se amestecă bine înainte de utilizare.

**Fertilizare**

1. Se identifică femele mari, gestante, din populația dorită; femelele sunt gata de presare numai atunci când se pot vedea ouăle ieșind din cloacă. Femelele pregătite au o postură caracteristică cu capul în sus.
2. Se presează ușor cu un deget pe partea laterală a peștelui în direcția spre coadă pentru a stimula expulzarea ouălor într-un vas Petri proaspăt. Acțiunea se repetă pe cealaltă parte, apoi peștele este întors în bazin.
3. Ouăle pot fi răspândite (formând un monostrat) cu ajutorul unei pensule fine. Este important să se încerce expunerea a cât mai multor ouă la spermă maximalizând astfel aria suprafeței ouălor. Notă importantă: Ouăle se mențin umede prin plasarea unui șervet umed în jurul lor (este important ca ouăle să nu intre în contact direct cu apa pentru că acest lucru poate întârzi prematur corionul, împiedicând fertilizarea). Există o mare variație a numărului de ouă produse de fiecare femelă, dar ca o medie, ar trebui să se obțină cu ușurință aproximativ 150 de ouă de la o singură femelă gestantă.
4. 25μl de spermă în amestecul Hank se aplică în mod uniform pe întreaga suprafață a ouălor cu ajutorul unei pensule. Ouăle se vor întări rapid și își vor schimba culoarea (într-un minut) odată cu începerea fertilizării. Dacă numărul estimat de ouă este mai mare de 150 procedura se repetă. În mod similar, dacă ouăle nu se întăresc într-un minut se mai adaugă spermă. Notă importantă: Adăugarea de spermă suplimentară nu îmbunătățește neapărat rata de fertilizare.
5. Ouăle și soluția de spermă trebuie lăsate să „interacționeze” timp de minimum 15 minute, iar ouăle fertilizate trebuie introduse în acvariile de expunere după 1,5 ore de la fertilizare.
6. Procedura se repetă utilizând o altă femelă până se colectează numărul dorit de ouă.
7. Se păstrează câteva ouă din ultimul lot și se fixează în acid acetic 10 %.

**▼ M6****Numărarea și distribuirea ouălor în acvariile de testare**

1. Ouăle trebuie să fie distribuite în mod uniform între fiecare nivel de tratament pentru evitarea rezultatelor incorecte din cauze genetice. Fiecare lot de ouă fertilizate trebuie separat în grupe de mărimi egale (număr egal cu nivelurile de tratament) folosind un instrument neascuțit (forceps entomologic cu lame late sau o ansă de inoculare). În cazul în care se vizează 4 replici per tratament, fiecare cu 20 de ouă, trebuie să se distribuie 80 ouă per acvariu de expunere. Notă importantă: Este recomandabil să se adauge un supliment de 20 % (adică 96 de ouă per nivel de tratament) până când este sigur că se obțin rate de fertilizare de 100 %.
2. Ouăle de ghidrin sunt foarte predispuse la infecții micotice în afara cuibului păzit de tată. În această privință, tratarea tuturor ouălor cu albastru de metilen în primele 5 de zile ale testului are o importanță capitală. O soluție stoc de albastru de metilen este preparată la concentrația de 1 mg/ml și este adăugată în acvariile de expunere pentru a se obține o concentrație finală maximă de 2,125 mg/l. Notă importantă: Ghidrinii nu trebuie să fie expuși la albastru de metilen odată eclozați, astfel încât sistemul trebuie să fie lipsit de albastru de metilen până în ziua 6.
3. Ouăle se inspectează în fiecare zi și orice ouă moarte sau nefertilizate sunt înregistrate ca atare. Notă importantă: Ouăle nu trebuie să ajungă niciodată în afara apei până când eclozează, chiar și pentru perioade foarte scurte.

▼ **M6****C.42. BIODEGRADABILITATEA ÎN APĂ DE MARE****INTRODUCEREA GENERALĂ**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 306 (1992). Atunci când au fost elaborate metodele de testare originale, nu se știa în ce măsură rezultatele testelor de screening pentru ușurința biodegradabilității, utilizând apă dulce cu inocul de apă de canal sau nămol activat, ar putea fi aplicate mediului marin. Cu privire la acest subiect au fost raportate rezultate variabile [de exemplu (1)].
2. Multe ape reziduale industriale, care conțin o varietate de substanțe chimice, ajung în mare fie prin descărcare directă, fie prin intermediul unor estuare și râuri în care timpii de staționare sunt mici în comparație cu perioada necesară pentru biodegradarea completă a multora dintre substanțele chimice prezente. Având în vedere conștientizarea crescândă a nevoii de a proteja mediul marin împotriva unor cantități din ce în ce mai mari de substanțe chimice și necesitatea de a estima concentrația probabilă a substanțelor chimice în mare, au fost elaborate metode de testare a biodegradabilității în apa de mare.
3. Metodele descrise aici folosesc apă de mare naturală atât ca fază apoasă, cât și ca sursă de microorganisme. În încercarea de a respecta metodele privind ușurința biodegradabilității în apă dulce, a fost investigată utilizarea apei de mare ultrafiltrate și a sedimentelor marine ca inocul. Aceste investigații au fost lipsite de succes. Prin urmare, mediul de testare este apa de mare naturală pretratată pentru îndepărtarea particulelor grosiere.
4. Pentru a evalua biodegradabilitatea completă prin metoda agitării flaconului, trebuie să fie utilizate concentrații relativ mari ale substanței testate din cauza sensibilității mici a metodei analitice de determinare a carbonului organic dizolvat (*dissolved organic carbon* – DOC). Acesta, necesită în schimb adăugarea la apa de mare a unor nutrienți minerali (N și P), ale căror concentrații mici ar limita înlăturarea DOC. În metoda cu flaconul închis este de asemenea necesar să se adauge nutrienți din cauza concentrației substanței testate adăugate.
5. Prin urmare, metodele nu sunt teste pentru ușurința biodegradabilității deoarece nu se adaugă inocul în plus față de microorganismele deja prezente în apa de mare. Teste nici nu simulează mediului marin, întrucât se adaugă nutrienți, iar concentrația substanței testate este mult mai mare decât ar fi prezentă în mare. Din aceste motive, metodele sunt propuse în cadrul unei noi secțiuni, „Biodegradabilitatea în apă de mare”.

**APLICARE**

6. Rezultatele testelor, care ar fi aplicate deoarece modelul de utilizare și de eliminare a substanței în cauză indică o cale către mare, oferă o primă impresie asupra biodegradabilității în apa de mare. Dacă rezultatul este pozitiv (îndepărtare > 70 % DOC; > 60 % ThOD – *theoretical oxygen demand*), se poate concluziona că există un potențial pentru biodegradare în mediul marin. Cu toate acestea, un rezultat negativ nu exclude un astfel de potențial, însă indică faptul că este necesar un studiu suplimentar, de exemplu, utilizând o concentrație a substanței testate cât mai mică.

▼ **M6**

7. În orice caz, dacă o valoare mai definitivă pentru rata sau gradul de biodegradare în apa de mare într-un anumit loc este necesară, trebuie aplicate alte metode mai complexe și mai sofisticate și, prin urmare, mai costisitoare. De exemplu, ar putea fi aplicat un test de simulare folosind o concentrație a substanței testate mai apropiată de concentrația din mediu probabilă. De asemenea, apa de mare nefortificată și nepretrată prelevată din locația de interes ar putea fi utilizată, iar biodegradarea primară ar putea fi urmată de analiza chimică specifică. Pentru biodegradabilitatea completă, ar fi necesare substanțe marcate cu  $^{14}\text{C}$  pentru a se putea măsura la concentrații care reflectă realist concentrațiile din mediu ratele dispariției  $^{14}\text{C}$  organic solubil și producția de  $^{14}\text{CO}_2$ .

**ALEGEREA METODELOR**

8. Selectarea metodei de utilizat depinde de o serie de factori; tabelul următor ajută la procesul de selecție. În timp ce substanțele cu solubilitate în apă sub echivalentul de 5 mg C/l nu pot fi testate prin metoda agitării flaconului, cel puțin, în principiu, substanțele puțin solubile în apă pot fi testate prin metoda de testare cu flacon închis.

*Tabel***Avantajele și dezavantajele testării prin metoda agitării flaconului și a flaconului închis**

| METODĂ                     | AVANTAJE   | DEZAVANTAJE  |
|----------------------------|--|--|
| <b>AGITAREA FLACONULUI</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— aparatură simplă cu excepția analizorului C</li> <li>— o durată de 60 de zile nu constituie o problemă</li> <li>— fără interferență din partea nitrificării</li> <li>— poate fi adaptată pentru substanțe volatile</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>— necesită analizorul C</li> <li>— utilizează 5 – 40 mg DOC/l, poate avea efect inhibitor</li> <li>— determinarea DOC este dificilă la concentrații mici în apa de mare (efect al clorurilor)</li> <li>— uneori DOC este mai mare în apa de mare</li> </ul>   |
| <b>FLACON ÎNCHIS</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>— aparatură simplă</li> <li>— determinare finală simplă</li> <li>— utilizează concentrație mică de substanță testată (2 mg/l), prin urmare, șanse mai mici de inhibiție</li> <li>— poate fi adaptată cu ușurință pentru substanțe volatile</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— poate fi dificil de menținut etanșeitatea flacoanelor</li> <li>— creșterea de bacterii pe peretele flaconului poate conduce la valori false</li> <li>— valorile absorbției de <math>\text{O}_2</math> în martor pot fi mari în special după 28 de zile; ar putea fi eliminate prin învechirea apei de mare</li> <li>— posibilă interferență cu absorbția de <math>\text{O}_2</math> prin nitrificare</li> </ul> |

**METODA AGITĂRII FLACONULUI****INTRODUCERE**

1. Această metodă este o variantă cu apă de mare a Testului de screening modificat al OCDE descris în capitolul C.4B din prezenta anexă (2). A fost finalizată în urma unui test interlaboratoare organizat pentru Comisia Europeană (CE) de Institutul danez pentru calitatea apei (3).
2. La fel ca în cazul metodei de testare cu flacon închis utilizând apă de mare, rezultatele acestui test nu trebuie să fie considerate drept indicatori ai ușurinței biodegradabilității, însă trebuie să fie utilizate pentru a obține informații privind biodegradabilitatea substanțelor în mediile marine.



▼ **M6****PRINCIPIUL METODEI**

3. O cantitate predeterminată de substanță testată este dizolvată în mediul de testare pentru a se obține o concentrație de 5 – 40 mg de carbon organic dizolvat (DOC)/l. Dacă limitele sensibilității analizelor carbonului organic sunt îmbunătățite, poate fi avantajoasă utilizarea de concentrații mai mici ale substanței testate, în special pentru substanțele inhibitoare. Soluția substanței testate în mediul de testare este incubată în condiții aerobe cu agitare la întuneric sau la lumină difuză și la o temperatură fixă controlată (controlată la  $\pm 2$  °C) care în mod normal variază între 15 și 20 °C. În cazurile în care obiectivul studiului este acela de a simula condițiile de mediu, testele pot fi efectuate în afara acestui interval normal de temperatură. Durata testului maximă recomandată este de aproximativ 60 de zile. Degradarea este urmată de măsurători ale DOC (degradare completă) și, în unele cazuri, prin analize specifice (degradare primară).

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ**

4. Pentru a ști dacă testul poate fi aplicat unei anumite substanțe, trebuie să fie cunoscute anumite proprietăți ale acesteia. Trebuie stabilit conținutul de carbon organic din substanță, volatilitatea acesteia trebuie să fie astfel încât nu existe pierderi semnificative pe durata testului, iar solubilitatea ei în apă trebuie să fie mai mare decât echivalentul a 25 – 40 mg C/l. În plus, substanța testată nu trebuie să se absoarbă în mod semnificativ pe suprafața sticlei. Sunt necesare informații privind puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale substanței testate pentru ca rezultatele obținute să poată fi interpretate, în special atunci când rezultatul se situează aproape de nivelul de „trecere”.
5. Informațiile privind toxicitatea substanței testate pentru bacterii, de exemplu astfel cum este măsurată în testele ratei respirației pe termen scurt (4), pot fi utile atunci când sunt selectate concentrațiile de testare corespunzătoare și pot fi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor mici ale biodegradării. Cu toate acestea, astfel de informații nu sunt întotdeauna suficiente pentru interpretarea rezultatelor obținute în testarea biodegradării, iar procedura descrisă la punctul 18 este mai adecvată.

**SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

6. Trebuie utilizate substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea microbiană a eșantionului de apă de mare. Benzoatul de sodiu, acetatul de sodiu și anilina sunt exemple de substanțe care pot fi utilizate în acest scop. Substanțele de referință trebuie să se degradeze într-un interval de timp rezonabil de scurt, altfel se recomandă repetarea testului folosind un alt eșantion de apă de mare.
7. În testul interlaboratoare organizat de CE, în care eșantioanele de apă de mare au fost prelevate din diferite locații și în diferite momente din cursul unui an (3), faza de latență ( $t_L$ ) și timpul necesar obținerii unei degradări de 50 % ( $t_{50}$ ), cu excepția fazei de latență, au fost de 1 – 4 zile și, respectiv, de 1 – 7 zile pentru benzoatul de sodiu. În ceea ce privește anilina,  $t_L$  a variat între 0 și 10 zile, în timp ce  $t_{50}$  a variat între 1 și 10 zile.

**REPRODUCIBILITATEA ȘI SENSIBILITATEA METODEI**

8. Reproducibilitatea metodei a fost stabilită în urma testului interlaboratoare (3). Cea mai mică concentrație a substanței testate, pentru care această metodă poate fi utilizată cu analiza DOC, este determinată în mare măsură prin limita de detectare a analizei carbonului organic (aproximativ 0,5 mg C/l, în prezent) și prin concentrația de carbon organic dizolvat în apa de mare utilizată (în general de ordinul a 3 – 5 mg/l pentru apa de mare din larg). Concentrația de fond a DOC nu trebuie să depășească în jur de

**▼ M6**

20 % din concentrația DOC total după adăugarea substanței testate. Dacă nu este fezabil, concentrația de fond a DOC poate fi redusă uneori prin învechirea apei de mare înainte de testare. Dacă metoda este folosită numai cu analiza chimică specifică (prin care se măsoară degradarea primară), investigatorul trebuie să documenteze, prin furnizarea de informații suplimentare, dacă se poate preconiza o degradare completă. Informațiile suplimentare pot consta în rezultatele obținute în urma altor teste privind biodegradabilitatea cu ușurință sau inerentă.

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură**

9. Aparatură obișnuită de laborator și:
  - a. Dispozitiv de agitare care să poată conține flacoane Erlenmeyer de 0,5 – 2 litri, fie cu control automat al temperaturii, fie utilizat într-o cameră cu o temperatură constantă de 15 – 20 °C controlată la  $\pm 2$  °C;
  - b. Flacoane Erlenmeyer de 0,5 – 2 litri cu gâtul îngust;
  - c. Dispozitive de filtrare cu membrană, sau centrifuge;
  - d. Filtre cu membrană, 0,2 – 0,45  $\mu\text{m}$ ;
  - e. Analizor de carbon;
  - f. Echipamente pentru analize specifice (opțional).

**Apa de mare**

10. Se prelevează un eșantion de apă de mare într-un recipient curățat cu atenție și se transportă la laborator, de preferință în termen de o zi sau două de la prelevare. Pe durata transportului, temperatura eșantionului nu trebuie lăsată să depășească semnificativ temperatura care urmează să fie utilizată în test. Se identifică cu precizie locația de unde a fost prelevat eșantionul și se descrie situația poluării și nutrienților. În special pentru apele de coastă, această caracterizare trebuie să includă numărul coloniilor microbiene heterotrofe și determinarea concentrațiilor azotatului, amoniacului și fosfatului dizolvați.
11. Se furnizează următoarele informații pentru eșantionul de apă de mare:
  - data prelevării;
  - adâncimea de prelevare;
  - aspectul eșantionului – turbure etc.;
  - temperatura la momentul prelevării;
  - salinitatea;
  - DOC;
  - intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test.
12. În cazul în care conținutul de DOC din eșantionul cu apă de mare este mare (punctul 8), se recomandă ca apa de mare să fie învechită timp de aproximativ o săptămână înainte de utilizare. Învechirea se realizează prin depozitare în condiții aerobe la temperatura de testare la întuneric sau la lumină

**▼ M6**

difuză. Dacă este necesar, condițiile aerobe sunt menținute prin aerare ușoară. Pe durata învechirii, conținutul materialului organic ușor degradabil este redus. În testul interlaboratoare (3), nu au fost observate diferențe între potențialele de degradare ale eșantioanelor de apă de mare învechită sau recent prelevate. Înainte de utilizare, apa de mare se tratează în prealabil pentru a îndepărta particulele mari, de exemplu prin filtrarea cu ajutorul unui filtru din nailon sau al unui filtru de hârtie cu porozitate mare (fără membrană sau filtre GF-C) sau prin sedimentare și decantare. Procedura utilizată trebuie raportată. Pretratamentul se efectuează după învechire, dacă se utilizează.

**Soluții stoc pentru nutrienți minerali**

13. Se prepară următoarele soluții stoc folosind reactivi de puritate analitică:

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
| (a) | Ortofosfat diacid monopotasie, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                               | 8,5 g   |
|     | Ortofosfat acid dipotasie, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                   | 21,75 g |
|     | Ortofosfat acid disodic dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,3 g  |
|     | Clorură de amoniu, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,5 g   |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (b) | Clorură de calciu, $\text{CaCl}_2$  | 27,5 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (c) | Sulfat de magneziu heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             | 22,5 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (d) | Clorură de fier (III) hexahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0,25 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |

Precipitarea în soluție (d) poate fi prevenită prin adăugarea unei picături de HCl concentrat sau a 0,4 g de acid etilendiaminotetraacetic (EDTA, sare disodică) per litru. Dacă se formează un precipitat într-o soluție stoc, aceasta trebuie înlocuită cu o soluție nou preparată.

**Pregătirea mediului de testare**

14. Se adaugă 1 ml din fiecare soluție stoc menționată mai sus per litru de apă de mare pretată.

**Inoculul**

15. Nu se adaugă un inocul specific în plus față de microorganismele care sunt deja prezente în apa de mare. Se determină (opțional) numărul de heterotrofe care formează colonii în mediul de testare cu apă de mare (și, de preferință, și în eșantioanele de apă de mare originale), de exemplu, prin numărarea pe placă, utilizând agar marin. Acest lucru este de dorit în special pentru eșantioanele prelevate din locații costiere sau poluate. Se verifică activitatea microbiană heterotrofă în apa de mare prin realizarea unui test cu o substanță de referință.

**▼ M6****Pregătirea flacoanelor**

16. Se asigură că toate vasele din sticlă sunt curățate foarte atent, nu trebuie să fie neapărat sterile (de exemplu, folosind acid clorhidric alcoolic), se clătesc și se usucă înainte de utilizare pentru a evita contaminarea cu reziduuri rezultate din teste anterioare. Flacoanele trebuie, de asemenea, să fie curățate înainte de prima utilizare.
17. Se evaluează substanțele testate în flacoane duplicat simultan, împreună cu un singur flacon pentru substanța de referință. Se realizează un test martor, în duplicat, fără substanța testată sau de referință, pentru determinarea valorilor analitice ale matorului. Se dizolvă substanțele testate în mediul de testare – ele pot să fie adăugate în mod convenabil prin intermediul unei soluții stoc concentrate – pentru a asigura concentrațiile inițiale dorite, în mod normal de 5 – 40 mg DOC/l. Se testează substanța de referință, în mod normal la o concentrație inițială corespunzătoare de 20 mg DOC/l. În cazul în care sunt utilizate soluții stoc ale substanței testate și/sau de referință, se asigură faptul că salinitatea mediului de apă de mare nu este modificat în mod semnificativ.
18. În cazul în care sunt estimate efecte toxice sau dacă acestea nu pot fi excluse, se recomandă includerea unui experiment privind inhibarea, în duplicat, în protocolul de testare. Se adaugă substanțele testate și de referință în același vas, concentrația substanței de referință fiind, în mod normal, aceeași cu cea din testul de control (și anume 20 mg DOC/l) pentru a permite de comparațiile.
19. Se varsă cantități adecvate de soluții de testare în flacoanele Erlenmeyer (până la aproximativ jumătatea volumului, ceea ce reprezintă o cantitate convenabilă) și apoi se acoperă fiecare flacon în mod neermetic (folie de aluminiu) pentru a permite schimbul gazos dintre flacon și aerul ambiental. (În cazul în care se utilizează analiza DOC, dopurile de vată nu sunt adecvate). Vasele se plasează pe agitator și se agită în mod continuu cu viteză redusă (de exemplu, 100 rpm) pe durata testului. Se controlează temperatură (15 – 20 °C și în intervalul  $\pm 2$  °C) și se protejează vasele de lumină pentru a evita creșterea de alge. Se asigură că aerul nu conține materiale toxice.

**Test fizico-chimic de control (opțional)**

20. Dacă se suspectează degradarea abiotică sau mecanisme de pierdere, precum hidroliza (problemă care apare numai în cazul unei analize specifice), volatilizarea sau absorbția, se recomandă efectuarea unui test de control fizico-chimic. Acesta poate fi realizat prin adăugarea de clorură de mercur (II) ( $\text{HgCl}_2$ ) <sup>(1)</sup> (50 – 100 mg/l) în vase cu substanțe testate pentru a opri activitatea microbiană. O scădere semnificativă a DOC sau a concentrației substanței specifice în testul de control fizico-chimic indică prezența unor mecanisme de îndepărtare abiotice. (Dacă se utilizează clorură de mercur, trebuie să se acorde atenție interferențelor sau dezactivării catalizatorului în analiza DOC).

**Numărul de flacoane**

21. Într-un test tipic sunt folosite următoarele flacoane:

Flacoanele 1 & 2 – care conțin substanța testată (suspensia de testare);

Flacoanele 3 & 4 – care conțin numai apă de mare (martor);

Flaconul 5 – care conține substanța de referință (control procedură);

Flaconul 6 – care conține substanța testată și de referință (control toxicitate) – opțional;

Flaconul 7 – care conține substanța testată și agentul de sterilizare (control steril abiotic) – opțional.

<sup>(1)</sup> Clorura de mercur (II) ( $\text{HgCl}_2$ ) este o substanță foarte toxică care trebuie manipulată luând măsuri de precauție adecvate. Deșeurile apoase care conțin această substanță trebuie evacuate în mod corespunzător; ele nu trebuie să fie eliminate în sistemul pentru ape reziduale.

**▼ M6****Analiza DOC**

22. Pe parcursul testului, eșantioanele se extrag la intervale adecvate pentru analiza DOC (apendicele 1). Eșantioanele se prelevează întotdeauna la începutul testului (ziua 0) și în ziua 60. Cel puțin cinci eșantioane în total sunt necesare pentru a descrie evoluția în timp a degradării. Nu se poate indica un calendar fix pentru eșantionare întrucât viteza de biodegradare variază. Se determină DOC în duplicat pentru fiecare eșantion.

**Eșantionarea**

23. Volumul necesar de eșantioane depinde de metoda de analiză (analiză specifică), de analizorul de carbon utilizat și de procedura (filtrarea cu membrană sau centrifugarea) selectată pentru tratamentul eșantionului înainte de determinarea carbonului (punctele 25 și 26). Înainte de eșantionare, trebuie să se asigure că mediul de testare este bine amestecat și că orice material aderent pe peretele flaconului este dizolvat sau suspendat.
24. Se filtrează cu membrană sau se centrifughează imediat după eșantionare. Dacă este necesar, eșantioanele filtrate sau centrifugate se depozitează la 2 – 4 °C timp de 48 de ore sau sub – 18 °C pentru perioade de timp mai lungi (dacă se cunoaște faptul că substanța va rămâne neafectată, se acidificază la pH 2 înainte de depozitare).
25. Filtrele cu membrană (0,2 – 0,45 μm) sunt adecvate dacă se asigură că acestea nu eliberează carbon și nu absorb substanța în etapa de filtrare, de exemplu, filtre cu membrană din policarbonat. Anumite filtre cu membrană sunt impregnate cu agenți tensioactivi pentru hidrofilizare și pot elibera cantități considerabile de carbon dizolvat. Aceste filtre se pregătesc prin fierberea în apă deionizată pe parcursul a trei perioade consecutive, fiecare cu durata de o oră. După fierbere, filtrele se depozitează în apă deionizată. Primii 20 ml de filtrat se elimină.
26. Centrifugarea eșantioanelor poate fi aleasă ca alternativă la filtrarea cu membrană. Se realizează centrifugarea la  $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$  (~ 4 000 g) timp de 15 minute, de preferință într-o centrifugă frigorifică.

*Notă:* Diferențierea dintre carbonul organic total (*Total Organic Carbon* – TOC) și DOC (TOC/DOC) prin centrifugare la concentrații foarte mici nu pare să funcționeze, deoarece fie nu au fost îndepărtate toate bacteriile, fie carbonul, ca parte a plasmelor bacteriene, este redizolvat. La concentrații mai mari (> 10 mg C per litru), eroarea în urma centrifugării pare a fi comparativ mică.

**Frecvența eșantionării**

27. Dacă analizele sunt efectuate imediat după eșantionare, se evaluează următorul moment de eșantionare, luând în considerare rezultatul determinării analitice.
28. Dacă eșantioanele sunt conservate (punctul 24) pentru o analiză ulterioară, trebuie prelevate mai multe eșantioane decât numărul minim de cinci. Se analizează mai întâi ultimele eșantioane prelevate și, printr-o selecție pas cu pas „inversă” a eșantioanelor adecvate pentru analiză, este posibilă obținerea unei bune descrieri a curbei de biodegradare cu un număr relativ mic de determinări analitice. În cazul în care până la sfârșitul testului nu există degradare, nu mai este necesară analiza de eșantioane suplimentare, și în această situație, strategia „inversă” poate asigura economisirea unei părți considerabile a costurilor analitice.

**▼ M6**

29. Dacă se observă un platou al curbei de degradare înainte de ziua 60, se încheie testul. Dacă degradarea a început în mod evident înainte de ziua 60, dar nu a atins un platou, experimentul se prelungește pentru o perioadă suplimentară.

**DATE ȘI RAPORTARE****Tratamentul rezultatelor**

30. Se înregistrează rezultatele analitice pe fișa de date anexată (apendicele 2) și se calculează valorile biodegradării pentru substanțele testată și de referință pe baza ecuației:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

unde:

$D_t$  = degradarea în procent de îndepărtare a DOC sau a substanței specifice în momentul  $t$ ;

$C_0$  = concentrația inițială a DOC sau a substanței specifice în mediul de testare;

$C_t$  = concentrația DOC sau a substanței specifice în mediul de testare la momentul  $t$ ,

$C_{bl(0)}$  = concentrația inițială a DOC sau a substanței specifice în martor,

$C_{bl(t)}$  = concentrația DOC sau a substanței specifice în martor la momentul  $t$ ;

31. Se indică degradarea sub formă de procent al îndepărtării DOC (degradare completă) sau a substanței specifice (degradare primară) la momentul  $t$ . Concentrațiile DOC se calculează cu rotunjire la cea mai apropiată zecime de mg/l și se rotunjesc valorile medii ale  $D_t$  la cel mai apropiat procent întreg.
32. Se ilustrează în mod grafic curba de degradare într-o diagramă astfel cum se indică în figura „Validitatea și interpretarea rezultatelor”. Dacă există suficiente date, pornind de la această curbă, se calculează faza de latență ( $t_L$ ) și timpul necesar pentru a obține îndepărtarea în proporție de 50 % după încheierea fazei de latență ( $t_{50}$ ).

**Raportul privind testul**

33. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

*Substanța testată:*

- natura fizică și, dacă este relevant, proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare.

*Condiții de testare:*

- locul prelevării de eșantioane și descrierea sa; situația poluării și a nutrienților (numărul coloniilor, azotat, amoniu, fosfat, dacă este cazul);
- caracteristicile eșantionului [data eșantionării, adâncimea, aspectul, temperatura, salinitatea, DOC (opțional), intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test];

**▼ M6**

- metoda utilizată (dacă este cazul) pentru învechirea apei de mare;
- metoda utilizată pentru pretratarea (filtrare/sedimentare) apei de mare;
- metoda utilizată pentru determinarea DOC;
- metoda utilizată pentru analize specifice (opțional);
- metoda utilizată pentru determinarea numărului de heterotrofe în apa de mare (metoda de numărare pe placă sau o procedură alternativă) (opțional);
- alte metode (opțional) utilizate pentru caracterizarea apei de mare (măsurători ale ATP etc.).

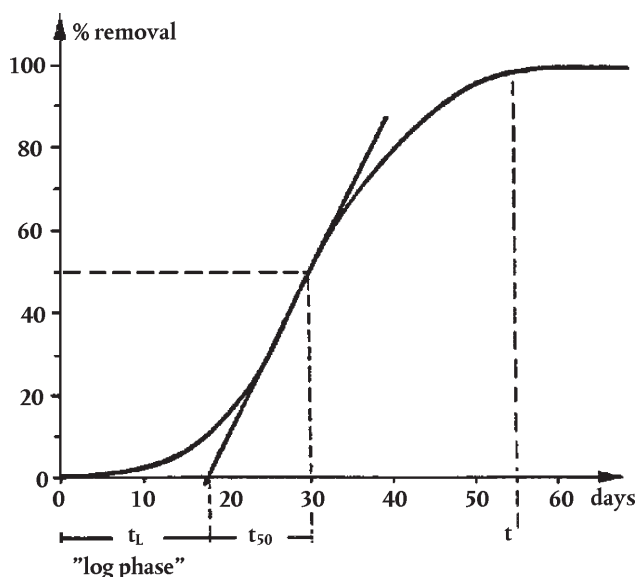
*Rezultate:*

- datele analitice raportate într-o fișă de date (appendicele 2);
- evoluția testului de degradare este reprezentată grafic într-o diagramă indicând faza de latență ( $t_L$ ), panta și timpul (începând cu sfârșitul fazei de latență) de obținere a îndepărtării în proporție de 50 % ( $t_{50}$ ). Faza de latență poate fi estimată grafic astfel cum se indică în figura din secțiunea „Validitatea și interpretarea rezultatelor” sau considerată în mod convenabil ca timpul necesar pentru o degradare de 10 %;
- procentul de degradare măsurat după 60 de zile sau la sfârșitul testului.

*Discutarea rezultatelor.***Validitatea și interpretarea rezultatelor**

34. Rezultatele obținute cu substanțele de referință, de exemplu benzoatul de sodiu, acetatul de sodiu sau anilina, trebuie să fie comparabile cu rezultatele obținute în testul interlaboratoare (3) (a se consulta secțiunea „Substanțe de referință”, punctul 7). Dacă rezultatele obținute cu substanțele de referință sunt atipice, testul trebuie repetat folosind alt eșantion de apă de mare. Deși rezultatele testelor de inhibiție nu pot fi întotdeauna ușor de interpretat din cauza aportului de DOC al substanței testate, o reducere semnificativă a ratei de îndepărtare a DOC total, în raport cu cea controlului, este un semn pozitiv că există efecte toxice.
35. Ca urmare a concentrațiilor de testare relativ mari utilizate în raport cu cea mai mare parte a sistemelor naturale (și în consecință, a unui raport nefavorabil între concentrațiile substanțelor testate și a altor surse de carbon), metoda trebuie considerată ca test preliminar care poate fi utilizat pentru a indica dacă o substanță este sau nu ușor degradabilă. Prin urmare, un rezultat slab nu înseamnă în mod necesar că substanța testată nu este biodegradabilă în medii marine, ci indică faptul că pentru a stabili aceasta vor fi necesare studii suplimentare.

Un exemplu de experiment teoretic privind degradarea ilustrând un mod fezabil de estimare a valorilor  $t_L$  (durata „fazei de latență”) și  $t_{50}$  (intervalul de timp, începând de la  $t_L$ ), necesare pentru a obține o îndepărtare în proporție de 50 %, este oferit în figura de mai jos.

▼ **M6****METODA FLACONULUI ÎNCHIS****INTRODUCERE**

1. Această metodă este o variantă de testare cu apă de mare prin testul cu flaconul închis (5) și a fost finalizată în urma unui test interlaboratoare organizat pentru Comisia Europeană (CE) de Institutul danez pentru calitatea apei (3).
2. La fel ca în cazul metodei însoțitoare de testare cu apă de mare prin agitarea flaconului, rezultatele acestui test nu trebuie să fie considerate drept indicații ale ușurinței biodegradabilității, însă trebuie să fie utilizate în mod specific pentru a obține informații privind biodegradabilitatea substanțelor din mediile marine.

**PRINCIPIUL METODEI**

3. O cantitate predeterminată de substanță testată este dizolvată în mediul de testare într-o concentrație, de obicei, de 2 – 10 mg de substanță testată per litru (pot fi utilizate una sau mai multe concentrații). Soluție este păstrată într-un flacon plin, închis, la întuneric, într-o baie cu temperatură constantă sau într-o încălțată controlată la  $\pm 1$  °C în intervalul 15 – 20 °C. În cazurile în care obiectivul studiului este acela de a simula condițiile de mediu, testele pot fi efectuate în afara acestui interval normal de temperatură, cu condiția efectuării ajutărilor adecvate pentru a controla temperatura. Degradarea este urmată de analizele oxigenului pe parcursul unei perioade de 28 de zile.
4. Testul interlaboratoare a indicat că dacă testul se prelungește peste perioada de 28 de zile, nu pot fi colectate informații utile, în cele mai multe dintre cazuri, din cauza interferențelor severe. Valorile consumului biologic de oxigen (*biological oxygen demand* – BOD) pentru martor au fost excesiv de mari, probabil din cauza creșterii parietale, ca urmare a neagitării și a nitrificării. Așadar, durata recomandată este de 28 de zile, însă dacă valoarea BOD pentru martor se menține în limita a 30 % (punctele 15 și 40), perioada de testare poate fi prelungită.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ**

5. Pentru a ști dacă testul poate fi aplicat unei anumite substanțe, trebuie să fie cunoscute anumite proprietăți ale acesteia. Este necesară formula empirică pentru a putea calcula consumul teoretic de oxigen (*theoretical oxygen demand* – ThOD) (a se vedea apendicele 3); altfel, consumul chimic de oxigen (*chemical oxygen demand* – COD) al substanței trebuie să fie determinat pentru a servi ca valoare de referință. Utilizarea COD este mai puțin satisfăcătoare, deoarece unele substanțe nu sunt complet oxidate în testul COD.



**▼ M6**

6. Solubilitatea substanței trebuie să fie de minimum 2 mg/l, deși, în principiu, ar putea fi testate substanțe mai puțin solubile (de exemplu, folosind ultrasonicarea), la fel cum ar putea fi testate și substanțele volatile. Sunt necesare informații privind puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale substanței testate pentru ca rezultatele obținute să poată fi interpretate, în special atunci când rezultatul se situează aproape de nivelul de „trecere”.
7. Informațiile privind toxicitatea substanței pentru bacterii, de exemplu astfel cum este măsurată în testele de respirație pe termen scurt (4), pot fi foarte utile atunci când sunt selectate concentrațiile de testare corespunzătoare și pot fi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor mici ale biodegradabilității. Cu toate acestea, astfel de informații nu sunt întotdeauna suficiente pentru interpretarea rezultatelor obținute în testarea biodegradării, iar procedura descrisă la punctul 27 este mai adecvată.

**SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ**

8. Trebuie utilizate substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea microbiană a eșantionului de apă de mare. Anilina, acetatul de sodiu sau benzoatul de sodiu (de exemplu) pot fi utilizate în acest scop. O degradare a acestor substanțe în proporție de cel puțin 60 % (din ThOD-ul lor) trebuie să intervină într-un interval de timp rezonabil de scurt, altfel se recomandă ca testul să fie repetat folosind alt eșantion de apă de mare.
9. În testul interlaboratoare organizat de CE în urma căruia au fost prelevate eșantioane de apă de mare din diferite locații și în momente diferite pe parcursul anului, faza de latență ( $t_L$ ) și timpul necesar obținerii unei degradări de 50 % ( $t_{50}$ ), neincluzând faza de latență, au fost de 0 – 2 zile și, respectiv, de  $1 \pm 4$  zile pentru benzoatul de sodiu. Pentru anilină, valorile  $t_L$  și  $t_{50}$  au fost de 0 – 7 zile și, respectiv, de 2 – 12 zile.

**REPRODUCTIBILITATE**

10. Reproducibilitatea metodelor a fost stabilită prin testul interlaboratoare organizat de CE (3).

**DESCRIEREA METODEI****Aparatură**

11. Echipament de laborator obișnuit și:
  - (a) Pot fi utilizate flacoane BOD de 250 – 300 ml cu dop de sticlă sau flacoane cu gât îngust de 250 ml cu dop de sticlă;
  - (b) Mai multe flacoane de 2-, 3- și 4- litri cu gradație pentru litri pentru pregătirea experimentului și pentru umplerea flacoanelor BOD;
  - (c) Baie de apă sau o cameră cu temperatură constantă pentru păstrarea flacoanelor la temperatură constantă ( $\pm 1$  °C) ferite de lumină.
  - (d) Echipament pentru analiza oxigenului dizolvat;
  - (e) Filtre cu membrană, 0,2 – 0,45  $\mu\text{m}$  (opțional);
  - (f) Echipamente pentru analize specifice (opțional).

**Apa de mare**

12. Se prelevează un eșantion de apă de mare într-un recipient curățat cu atenție și se transportă la laborator, de preferință în termen de o zi sau două după prelevare. Pe durata transportului, temperatura eșantionului nu trebuie lăsată să depășească semnificativ temperatura care urmează să fie utilizată în test.

**▼ M6**

13. Locația de unde a fost prelevat eșantionul se identifică cu precizie și se descrie situația poluării și a nutrienților. În special pentru apele de coastă sau poluate, această descriere trebuie să includă numărul coloniilor microbiene heterotrofe și determinarea concentrațiilor azotatului, amoniului și fosfatului dizolvați.
14. Se furnizează următoarele informații pentru eșantionul de apă de mare:
  - data prelevării;
  - adâncimea de prelevare;
  - aspectul eșantionului – turbure etc.;
  - temperatura la momentul prelevării;
  - salinitatea;
  - carbonul organic dizolvat (DOC);
  - intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test.
15. În cazul în care conținutul de DOC dintr-un eșantion se dovedește a fi mare sau în care se consideră că BOD pentru mator după 28 de zile va fi mai mare de 30 % din cel al substanțelor de referință, se recomandă ca apa de mare să fie învechită timp de aproximativ o săptămână înainte de utilizare.
16. Eșantionul se învechește prin depozitare în condiții aerobe la temperatura de testare, la întuneric sau la lumină difuză. Dacă este necesar, condițiile aerobe sunt menținute prin aerare ușoară. Pe durata învechirii, conținutul materialului organic ușor degradabil este redus. În testul interlaboratoare (3), nu au fost observate diferențe între potențialele de degradare ale eșantioanelor de apă de mare învechite sau recent prelevate.
17. Înainte de utilizare, apa de mare este tratată în prealabil pentru a îndepărta particulele mari, de exemplu prin filtrare cu ajutorul unui filtru din nailon sau al unui filtru de hârtie cu porozitate mare (fără membrană sau filtre GF-C) sau prin sedimentare și decantare. Procedura utilizată se raportează. După învechire se pretratează, dacă se utilizează.

**Soluții stoc pentru nutrienți minerali**

18. Se prepară următoarele soluții stoc folosind reactivi de puritate analitică:
 

|     |   |         |
|-----|---|---------|
| (a) | Ortofosfat diacid monopotasit, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                               | 8,5 g   |
|     | Ortofosfat acid dipotasit, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                   | 21,75 g |
|     | Ortofosfat acid disodic dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,3 g  |
|     | Clorură de amoniu, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,5 g   |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (b) | Clorură de calciu, $\text{CaCl}_2$  | 27,5 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (c) | Sulfat de magneziu heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             | 22,5 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |
| (d) | Clorură de fier (III) hexahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0,25 g  |
|     | Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.                            |         |

**▼ M6**

Precipitarea în soluție (d) poate fi prevenită prin adăugarea unei picături de HCl concentrat sau a 0,4 g de acid etilendiaminotetraacetic (EDTA, sare disodică) per litru. Dacă se formează un precipitat într-o soluție stoc, aceasta trebuie înlocuită cu o soluție nou preparată.

**Pregătirea mediului de testare**

19. Se adaugă pentru fiecare litru de apă de mare pretratată 1 l din fiecare dintre soluțiile stoc sus-menționate. Se saturează mediul de testare cu aer la temperatura de testare prin aerarea cu aer comprimat curat timp de aproximativ 20 de minute. Se determină concentrația oxigenului dizolvat pentru control. Concentrația saturată a oxigenului dizolvat ca funcție a salinității și temperatura pot fi citite în nomograma anexată la această metodă de testare (apendicele 4).

**Inoculul**

20. Nu se adaugă un inocul specific în plus față de microorganismele care sunt deja prezente în apa de mare. Se determină (opțional) numărul de heterotrofe care formează colonii în mediul de testare cu apă de mare (și, de preferință, și în eșantionul de apă de mare original), de exemplu, prin numărarea pe placă utilizând agar marin. Acest lucru este de dorit în special pentru eșantioanele prelevate din locații costiere sau poluate. Se verifică activitatea microbiană heterotrofă în apa de mare prin realizarea unui test cu o substanță de referință.

**Pregătirea flacoanelor de testare**

21. Se efectuează toate manipulările necesare, inclusiv învechirea și pretratarea apei de mare la temperatura de testare aleasă între 15 și 20 °C, asigurând curățenia, dar nu sterilitatea, tuturor vaselor din sticlă.
22. Se pregătesc grupuri de flacoane BOD pentru determinarea BOD cu substanțele testată și de referință în serii experimentale simultane. Se efectuează toate analizele pe flacoanele duplicat (martor, substanțe de referință și testată), adică se pregătesc două flacoane pentru fiecare determinare. Se efectuează analize cel puțin în zilele 0, 5, 15 și 28 (patru determinări). Pentru analizele oxigenului, patru determinări necesită un total de  $3 \times 2 \times 4 = 24$  de flacoane (martor, substanță de referință și substanță testată) și, prin urmare, aproximativ 8 litri de mediu de testare (pentru o concentrație de substanță testată).
23. Se prepară soluții separate pentru substanțele de referință și testată în flacoane mari cu un volum suficient (punctul 11) prin adăugarea mai întâi a substanțelor testată și de referință, fie direct, fie prin utilizarea unei soluții stoc concentrate în flacoanele mari parțial umplute. Se adaugă mediu de testare suplimentar pentru a se asigura concentrațiile dorite finale. În cazul în care sunt utilizate soluții stoc de substanță testată și/sau de referință, se asigură faptul că salinitatea mediului cu apă de mare nu este modificată în mod semnificativ.
24. Se selectează concentrațiile substanțelor testată și de referință ținând cont de:
  - (a) solubilitatea oxigenului dizolvat în apa de mare la temperatura de testare predominantă și salinitatea (a se vedea nomograma anexată – appendicele 4);
  - (b) valoarea BOD a apei de mare din martor; și
  - (c) biodegradabilitatea preconizată a substanței testate.

▼ **M6**

25. La 15 °C și 20 °C și la o salinitate de 32 de părți la mie (apă de ocean), solubilitatea oxigenului dizolvat este de aproximativ 8,1 și 7,4 mg/l, respectiv. Consumul de oxigen al apei de mare înseși (respirație martor) poate fi de 2 mg O<sub>2</sub>/l sau mai mult, în cazul în care apa de mare nu este învechită. Prin urmare, în vederea asigurării unei concentrații semnificative de oxigen care să rămână după oxidarea substanței testate, se utilizează o concentrație inițială a substanței testate de aproximativ 2 – 3 mg/l (în funcție de ThOD) pentru substanțele pentru care se preconizează că se vor degrada complet în condițiile testului (precum substanțele de referință). Substanțele mai puțin degradabile se testează la concentrații mai mari, de până la aproximativ 10 mg/l, cu condiția să nu apară efecte toxice. Efectuarea de teste paralele cu o concentrație mică (aproximativ 2 mg/l) și mare (aproximativ 10 mg/l) a substanței testate poate fi avantajoasă.
26. Un martor pentru oxigen trebuie să fie determinat în paralel în flacoanele care nu conțin nici substanță testată, nici substanță de referință.
27. Dacă trebuie determinate efecte inhibitorii, se pregătește următoarea serie de soluții în flacoane mari separate (punctul 13):
- (a) 2 mg/l de substanță ușor degradabilă, de exemplu orice substanță de referință menționată;
  - (b) x mg/l de substanță testată (x este în general 2);
  - (c) 2 mg/l de substanță ușor degradabilă plus x mg/l de substanță testată.

**Test fizico-chimic de control (opțional)**

28. Dacă se recurge la opțiunea utilizării de analize specifice, poate fi realizat un experiment fizico-chimic pentru a verifica dacă substanța testată este îndepărtată prin mecanisme abiotice, precum hidroliza sau adsorbția. Un test fizico-chimic de control poate fi efectuat prin adăugarea de clorură de mercur (II) (HgCl<sub>2</sub>)<sup>(1)</sup> (50 – 100 mg/l) în flacoanele duplicate cu substanță testată pentru a opri activitatea microbiană. O scădere semnificativă a concentrației substanței specifice în cursul testului indică prezența unor mecanisme de îndepărtare abiotice.

**Numărul de flacoane BOD într-o testare tipică**

29. Într-o testare tipică sunt folosite următoarele flacoane:
- cel puțin 8 care conțin substanța testată;
  - cel puțin 8 care conțin numai apă de mare fortificată cu nutrienți;
  - cel puțin 8 care conțin substanța de referință și dacă este necesar
  - 6 flacoane care conțin substanță testată și de referință (control pentru toxicitate).

**PROCEDURA**

30. După preparare, se sifonează imediat fiecare soluție, din sfertul inferior (nu din partea de jos) într-un flacon suficient de mare, pentru a umple respectivul grup de flacoane BOD. Imediat se analizează controalele zero (timp zero) pentru oxigenul dizolvat (punctul 33) sau se conservă pentru analiză chimică ulterioară prin precipitare cu MnCl<sub>2</sub> [clorură de mangan (II)] și NaOH (hidroxid de sodiu).

<sup>(1)</sup> Clorura de mercur (II) (HgCl<sub>2</sub>) este o substanță foarte toxică ce trebuie manipulată luând măsuri de precauție adecvate. Deșeurile apoase care conțin această substanță trebuie evacuate în mod corespunzător; ele nu trebuie să fie eliminate în sistemul pentru ape reziduale.

**▼ M6**

31. Se incubează flacoanele BOD paralele rămase la temperatura de testare (15 – 20 °C), se mențin în întineric și se scot din zona de incubare la intervale de timp adecvate (de exemplu, după minimum 5, 15 și 28 zile) și se analizează oxigenul dizolvat (punctul 33).
32. Se filtrează cu filtru cu membrană (0,2 – 0,45 μm) sau se centrifughează, timp de 15 minute, eșantioanele pentru analize specifice (opțional). Se depozitează timp de până la 48 de ore la 2 – 4 °C sau perioade mai lungi la – 18 °C, dacă nu sunt analizate imediat (dacă se știe că substanța testată nu va fi afectată, se acidifică la pH 2 înainte de depozitare).

**Determinarea oxigenului dizolvat**

33. Se determină concentrația oxigenului dizolvat folosind o metodă chimică sau electrochimică recunoscută la nivel național sau internațional.

**DATE ȘI RAPORTARE****Prelucrarea rezultatelor**

34. Se înregistrează rezultatele analitice pe fișele de date anexate (apendicele 5).
35. Se calculează BOD ca diferența de depleție de oxigen între un martor și o soluție a substanței testate în condițiile de testare. Se împarte depleție netă de oxigen la concentrația (G/V) substanței pentru a exprima BOD ca mg BOD/mg substanță testată. Degradarea este definită ca raportul dintre consumul biochimic de oxigen și, de preferință, consumul teoretic de oxigen (ThOD) sau consumul chimic de oxigen (COD) și se exprimă ca procent (a se vedea punctul 36).
36. Se calculează valorile biodegradării pentru fiecare moment de eșantionare pentru substanța chimică testată și pentru substanța de referință, utilizând una dintre ecuațiile:

$$\% \text{ biodegradare} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg substanță testată}}{\text{mg ThOD} / \text{mg substanță testată}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradare} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg substanță testată}}{\text{mg COD} / \text{mg substanță testată}} \times 100$$

unde:

ThOD = consumul teoretic de oxigen (calculare, appendicele 3)

COD = consumul chimic de oxigen, determinat experimental.

*Notă:* Uneori, cele două modalități de calculare (procent din ThOD sau procent din COD) nu furnizează aceleași rezultate; se preferă să utilizeze ThOD, deoarece unele substanțe nu sunt complet oxidate în testul COD.

37. Se ilustrează în mod grafic curba de degradare într-o diagramă (a se vedea un exemplu în secțiunea „Validitatea și interpretarea rezultatelor”). Dacă există suficiente date, din această curbă se calculează faza de latență ( $t_L$ ) și timpul necesar pentru a obține îndepărtarea în proporție de 50 % de la încheierea fazei de latență ( $t_{50}$ ).
38. Dacă se folosește analiza specifică (opțional), se precizează degradarea primară ca procent al îndepărtării substanței specifice în perioada de testare (corectată pentru martorii analitici).

**▼ M6****Raportul privind testul**

39. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

*Substanța testată:*

- natura fizică și, dacă este relevant, proprietățile fizico-chimice;
- date de identificare.

*Condiții de testare:*

- locul prelevării de eșantioane și descrierea sa: situația poluării și a nutrienților (numărul coloniilor, azotat, amoniu, fosfat, dacă este cazul);
- caracteristicile eșantionului [data eșantionării, adâncimea, aspectul, temperatura, salinitatea, DOC (opțional), intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test];
- metoda utilizată (dacă este cazul) pentru învechirea apei de mare;
- metoda utilizată pentru pretratarea (filtrare/sedimentare) apei de mare;
- metoda utilizată pentru determinarea COD (dacă este efectuată);
- metoda utilizată pentru măsurarea oxigenului;
- procedura de dispersie pentru substanțele care sunt puțin solubile în condițiile de testare;
- metoda utilizată pentru determinarea numărului de heterotrofe în apa de mare (metoda de numărare pe placă sau o procedură alternativă);
- metoda utilizată pentru determinarea DOC în apa de mare (opțional);
- metoda utilizată pentru analize specifice (opțional);
- alte metode opționale utilizate pentru caracterizarea apei de mare (măsurători ale ATP etc.).

*Rezultate:*

- datele analitice raportate în fișa de date (astfel cum este anexată, apendicele 5);
- evoluția testului de degradare reprezentată grafic într-o diagramă indicând faza de latență ( $t_L$ ), panta și timpul (începând cu sfârșitul fazei de latență) necesar atingerii absorbției finale a oxigenului proporție de 50 % ( $t_{50}$ ) cauzate de oxidarea substanței testate. Faza de latență poate fi estimată grafic astfel cum se indică în figura atașată sau considerată, în mod convențional, ca fiind timpul necesar pentru o degradare de 10 %;
- procentul de degradare măsurat după 28 de zile.

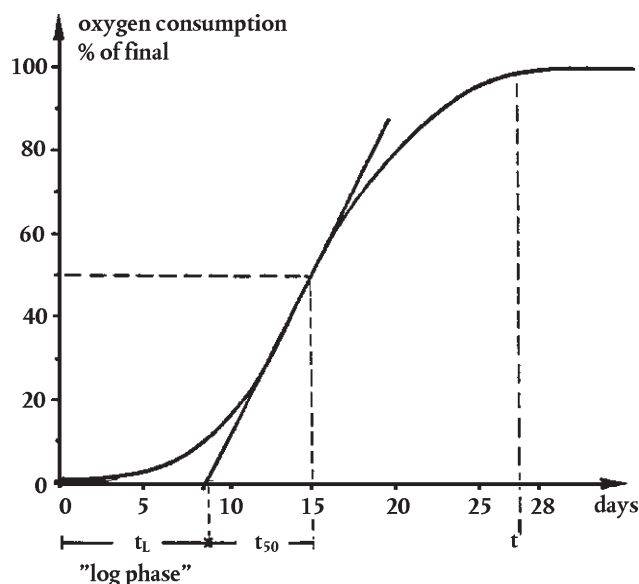
*Discutarea rezultatelor.***Validitatea și interpretarea rezultatelor**

40. Respirația martor nu trebuie să depășească 30 % din oxigenul din flaconul de testare. Dacă nu este posibil să se respecte acest criteriu folosind apă de mare proaspăt prelevată, apa de mare trebuie să fie învechită (stabilizată) înainte de utilizare.
41. Trebuie luată în considerare posibilitatea ca substanțele care conțin azot să afecteze rezultatele.

▼ **M6**

42. Rezultatele obținute cu substanțele de referință benzoat de sodiu și anilină trebuie să fie comparabile cu rezultatele obținute în testul interlaboratoare (3) (punctul 9). Dacă rezultatele obținute cu substanțele de referință sunt atipice, testul trebuie repetat folosind alt eșantion de apă de mare.
43. Substanța testată poate fi considerată inhibitoare pentru bacterii (la concentrația utilizată) dacă BOD a amestecului dintre substanța de referință și cea testată este mai mic decât suma BOD pentru soluțiile separate ale celor două substanțe.
44. Ca urmare a concentrațiilor relativ mari utilizate în test față de cea mai mare parte a sistemelor naturale și, în consecință, a unui raport nefavorabil între concentrațiile substanțelor testate și a altor surse de carbon, metoda trebuie considerată ca test preliminar care poate fi utilizat pentru a indica dacă o substanță este sau nu ușor biodegradabilă. Prin urmare, un rezultat slab nu înseamnă în mod necesar că substanța testată nu este biodegradabilă în medii marine, ci indică faptul că pentru a stabili acest aspect vor fi necesare studii suplimentare.

Mai jos este prezentat un exemplu de experiment de degradare teoretică ilustrând un mod fezabil de estimare a valorilor  $t_L$  (durata „fazei de latență”) și  $t_{50}$ , intervalul de timp (începând de la  $t_L$ ) necesare pentru a atinge 50 % din absorbția finală de oxigen cauzată de oxidarea substanței testate:



## BIBLIOGRAFIE

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
- (2) Chapter C.4-B of this Annex: Determination of „Ready” Biodegradability Part III Modified OECD Screening Test
- (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
- (4) Chapter C.11 of this Annex: Biodegradation — Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.
- (5) Chapter C.4-E of this Annex: Determination of „Ready” Biodegradability, Part VI. Closed Bottle Test.

▼ **M6***Apendicele 1***Determinarea carbonului organic din apa de mare****METODA AGITĂRII FLACONULUI**

Pentru determinarea carbonului organic dintr-un eșantion de apă, compușii organici din eșantion sunt oxidați la bioxid de carbon folosind în general una din următoarele trei tehnici:

- oxidare umedă prin persulfat/iradiere UV;
- oxidare umedă prin persulfat/temperatură crescută (116-130 °C);
- combustie.

CO<sub>2</sub> degajat este cuantificat folosind spectrometrie cu infraroșu sau titrimetrie. Alternativ, CO<sub>2</sub> este redus la metan, care este cuantificat cu un detector cu ionizare în flacără (*flame ionization detector* – FID).

Metoda cu persulfat/UV este frecvent utilizată pentru analiza apei „curate”, cu conținut mic de particule în suspensie. Ultimele două metode pot fi aplicate la cele mai multe tipuri de eșantioane de apă, metode cu persulfat/temperatură crescută-oxidare fiind cea mai potrivită pentru eșantioanele cu nivel mic, iar tehnica cu combustie fiind aplicabilă pentru eșantioane cu conținut de carbon organic nevolatil (*non-volatile organic carbon* – NVOC) mult peste 1 mg C/l.

**Interferențe**

Toate cele trei metode sunt dependente de eliminarea sau de compensarea carbonului anorganic (*inorganic carbon* – IC) prezent în eșantion. Epurarea CO<sub>2</sub> eșantionul acidificat este cea mai frecvent utilizată metodă de eliminare a IC, cu toate că aceasta determină și o pierdere de compuși organici volatili (1). Eliminarea completă sau compensarea IC trebuie să se asigure pentru fiecare matrice de eșantion, iar carbonul organic volatil (*volatile organic carbon* – VOC) trebuie să fie determinat în plus față de NVOC, în funcție de tipul de eșantion.

Concentrațiile mari de clorură au ca rezultat scăderea eficienței oxidării folosind metoda cu persulfat/UV (2). Aplicarea unui reactiv de oxidare modificat prin adăugarea de azotat de mercur (II) poate, totuși, să elimine această interferență. Se recomandă ca volumul maxim tolerabil al eșantionului să fie utilizat pentru a evalua fiecare tip de eșantion care conține clorură. Concentrațiile mari de sare din eșantionul analizat folosind metoda prin combustie poate provoca acoperirea cu sare a catalizatorului și coroziunea excesivă a tubului de ardere. Trebuie luate măsuri de precauție în conformitate cu manualul producătorului.

Eșantioanele de apă foarte tulburi, precum și eșantioanele care conțin particule poate fi oxidate incomplet atunci când se utilizează metoda persulfat/UV.

**Un exemplu de metodă adecvată**

Carbonul organic nevolatil este determinat prin oxidarea cu persulfat/iradiere UV și cuantificarea ulterioară a emisiilor de CO<sub>2</sub> degajate folosind spectrometrie nedispersivă cu infraroșu.

Reactivul de oxidare se modifică în conformitate cu sugestiile prezentate în referința (2), astfel cum se descrie în manualul producătorului:

- a) 8,2 g HgCl<sub>2</sub> și 9,6 g Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O se dizolvă în câteva sute de mililitri de apă de reacție cu o concentrație mică de carbon.
- b) 20 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> se dizolvă în soluție de sare mercurică.



**▼ M6**

c) 5 ml  $\text{HNO}_3$  (conc.) se adaugă la amestec.

d) reactivul este diluat până la 1 000 ml.

Interferența clorurii este îndepărtată cu ajutorul unui volum de eșantion de 40  $\mu\text{l}$  pentru clorură 10 % și al unui volum de eșantion de 200  $\mu\text{l}$  pentru clorură 1,9 %. Eșantioanele cu concentrații mari de clorură și/sau volumele mai mari de eșantioane pot fi analizate în baza acestei metode, cu condiția ca acumularea de clorură în vasul de oxidare să fie împiedicată. Determinarea carbonului organic volatil poate fi realizată ulterior, dacă este cazul, pentru tipul de eșantion în cauză.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Also of interest (gives a description of an autoanalysis system):

- (3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼ **M6***Apendicele 2***Biodegradarea în apa de mare****METODA AGITĂRII FLACONULUI****FIȘA DE DATE****1. LABORATOR:****2. DATE ÎNCEPERII TESTULUI:****3. SUBSTANȚA TESTATĂ:**

Denumire:

Concentrația soluției stoc: mg/l de substanță

Concentrația inițială în mediu,  $t_0$ : mg/l de substanță

: mg DOC/l

**4. APA DE MARE:**

Sursa:

Data prelevării:

Adâncimea de prelevare:

Aspectul la momentul prelevării (de exemplu, turbure etc.):

Salinitatea la prelevare: ‰

Temperatura la prelevare: °C

DOC „x” ore după prelevare: mg/l

Pretratare înainte de testare (de exemplu, filtrare, sedimentare, învechire, etc.):

Numărul coloniilor microbiene — eșantion inițial: colonii/ml

— la începutul testului: colonii/ml

Alte caracteristici:

**5. DETERMINĂRILE CARBONULUI:**

Analizorul de carbon:

|   | Flacon nr. |                   | DOC după n zile (mg/l) |       |       |       |       |
|---|------------|-------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|
|   |            |                   | 0                      | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Test: apă de mare fortificată cu nutrienți cu substanță testată | 1          | $a_1$             |                        |       |       |       |       |
|   |            | $a_2$             |                        |       |       |       |       |
|   |            | medie, $C_{a(t)}$ |                        |       |       |       |       |
|   | 2          | $b_1$             |                        |       |       |       |       |
|   |            | $b_2$             |                        |       |       |       |       |
|   |            | medie, $C_{b(t)}$ |                        |       |       |       |       |

▼ **M6**

|   | Flacon nr.   |                          | DOC după n zile (mg/l) |                |                |                |                |
|---|--|--------------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   |  |                          | 0                      | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>x</sub> |
| Martor: apă de mare fortificată cu nutrienți fără substanță testată | 1  | c <sub>1</sub>           |                        |                |                |                |                |
|   |  | c <sub>2</sub>           |                        |                |                |                |                |
|   |  | medie, C <sub>c(t)</sub> |                        |                |                |                |                |
|   | 2  | d <sub>1</sub>           |                        |                |                |                |                |
|   |  | d <sub>2</sub>           |                        |                |                |                |                |
|   |  | medie, C <sub>d(t)</sub> |                        |                |                |                |                |
|   | medie, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ |                          |                        |                |                |                |                |
|   |  |                          |                        |                |                |                |                |
|   |  |                          |                        |                |                |                |                |

6. **EVALUAREA DATELOR BRUTE:**

| Flacon nr. | Calcularea rezultatelor   | % Degradare după n zile |                |                |                |                |
|------------|---|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|            |   | 0                       | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>x</sub> |
| 1          | $D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$ | 0                       |                |                |                |                |
| 2          | $D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$ | 0                       |                |                |                |                |
| Medie (*)  | $D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$   | 0                       |                |                |                |                |

(\*) D<sub>1</sub> și D<sub>2</sub> nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

Notă: Formate similare pot fi folosite atunci când degradarea este urmată de o analiză specifică și pentru substanța de referință și controalele de toxicitate.

7. **DEGRADARE ABIOTICĂ (opțional)**

|   | Timp (zile)       |                   |
|---|-------------------|-------------------|
|   | 0                 | t                 |
| Concentrație DOC (mg/l) în controlul steril | C <sub>s(0)</sub> | C <sub>s(t)</sub> |

$$\% \text{ degradare abiotică} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

▼ **M6**

## Apendicele 3

**Calcularea consumului biochimic teoretic de oxigen**

## METODA FLACONULUI ÎNCHIS

ThOD al substanței  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$  cu masa moleculară (*molecular weight* – MW) se calculează în conformitate cu:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Acest calcul implică faptul că C este mineralizat la  $CO_2$ , H la  $H_2O$ , P la  $P_2O_5$  și Na la  $Na_2O$ . Halogenul este eliminat sub formă de halogenură de hidrogen, iar azotul sub formă de amoniac

Exemplu:

Glucoză  $C_6H_{12}O_6$ , MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left( 2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucoză}$$

Greutățile moleculare ale altor săruri decât cele ale metalelor alcaline sunt calculate pe baza ipotezei că respectivele săruri au fost hidrolizate.

Se presupune că sulful este oxidat la starea + 6.

Exemplu:

n-Dodecilbenzensulfonat de sodiu  $C_{18}H_{29}SO_3Na$ , MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left( 36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg substanță}$$

În cazul substanțelor care conțin azot, acesta poate fi eliminat sub formă de amoniac, nitrit sau nitrat corespunzând diferitelor consumuri biochimice teoretice de oxigen.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

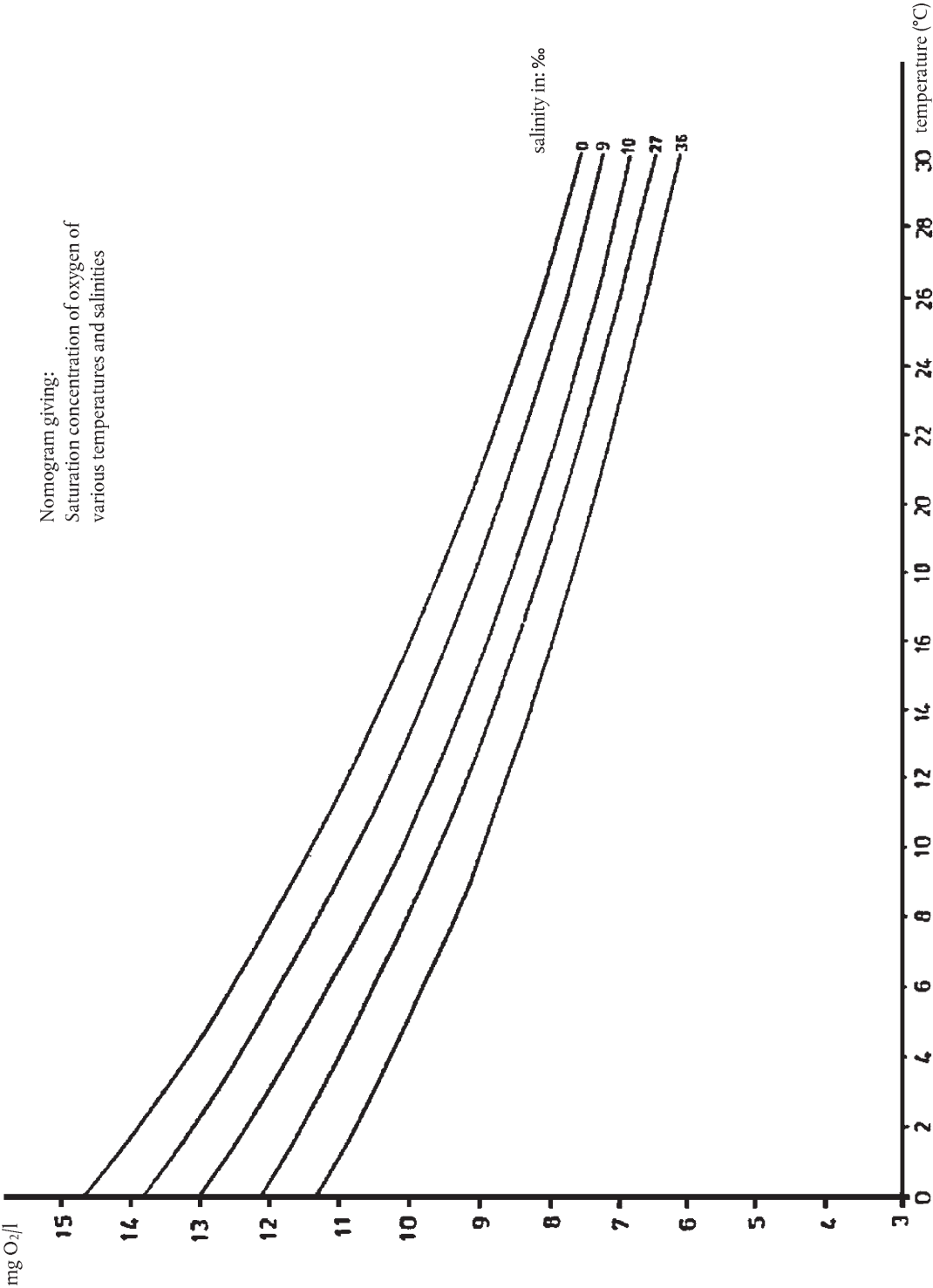
Se presupune că în cazul unei amine secundare a fost observată prin analiză formarea completă de nitrat:

$(C_{12}H_{25})_2NH$ , MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left( 48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg substanță}$$

▼ **M6**

Appendicele 4



▼ **M6***Apendicele 5***Biodegradarea în apa de mare****METODA FLACONULUI ÎNCHIS****FIȘA DE DATE****1. LABORATOR:****2. DATE ÎNCEPERII TESTULUI:****3. SUBSTANȚA TESTATĂ:**

Denumire:

Concentrația soluției stoc: mg/l

Inclusiv concentrația în mediul de apă de mare: mg/l

ThOD sau COD: mg O<sub>2</sub>/mg  
substanță testată**4. APA DE MARE:**

Sursa:

Data prelevării:

Adâncimea de prelevare:

Aspectul la momentul prelevării (de exemplu, turbiditate etc.):

Salinitatea la prelevare: ‰

Temperatura la prelevare: °C

DOC „x” ore după prelevare: mg/l

Pretratare înainte de testare (de exemplu, filtrare, sedimentare, învechire etc.):

Numărul coloniilor micro- — eșantion inițial: colonii/ml  
biene

— la începutul testului: colonii/ml

Alte caracteristici:

**5. MEDIU DE TESTARE:**

Temperatura după aerare: °C

Concentrația de O<sub>2</sub> după aerare și înainte de începerea testului: mg O<sub>2</sub>/l**6. DETERMINAREA OD:**

Metoda: Winkler/electrod

|  | Flacon nr.     |                             | mg O <sub>2</sub> /l după n zile |   |    |    |
|--|----------------|-----------------------------|----------------------------------|---|----|----|
|  |                |                             | 0                                | 5 | 15 | 28 |
| Test: apă de mare fortificată cu<br>nutrienți cu substanță testată | 1              | a <sub>1</sub>              |                                  |   |    |    |
|  | 2              | a <sub>2</sub>              |                                  |   |    |    |
|  | Media testului | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ |                                  |   |    |    |

▼ **M6**

|  | Flacon nr.   |                             | mg O <sub>2</sub> /l după n zile |   |    |    |
|--|--------------|-----------------------------|----------------------------------|---|----|----|
|  |              |                             | 0                                | 5 | 15 | 28 |
| Martor: apă de mare fortificată cu nutrienți, dar fără substanță testată | 1            | c <sub>1</sub>              |                                  |   |    |    |
|  | 2            | c <sub>2</sub>              |                                  |   |    |    |
|  | Medie martor | $m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$ |                                  |   |    |    |

*Notă:* Un format similar poate fi folosit pentru substanța de referință și controalele de toxicitate.

7. **CONSUM DE OD: % DEGRADARE ( %D):**

|  | Consum de OD după n zile |    |    |
|--|--------------------------|----|----|
|  | 5                        | 15 | 28 |
| $(m_b - m_t)^{(1)}$  |                          |    |    |
| $\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{\text{substanțătestată}(mg/l) \times ThOD} \times 100$ |                          |    |    |

(<sup>1</sup>) Aceasta presupune că  $m_{b(o)} = m_{t(o)}$ , unde  
 $m_{b(o)}$  = valoarea martor în ziua 0,  
 $m_{t(o)}$  = valoarea substanței de testare în ziua 0.  
Dacă  $m_{b(o)}$  nu este egal cu  $m_{t(o)}$ , se utilizează  $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$ , unde  
 $m_{b(x)}$  = valoarea martor în ziua x,  
 $m_{t(x)}$  = valoarea substanței de testare în ziua x.

## ▼ M6

C.43. **BIODEGRADABILITATEA ANAEROBĂ A SUBSTANTELOR ORGANICE DIN NĂMOLUL FERMENTAT: PRIN MĂSURAREA PRODUCERII DE GAZE**

## INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 311 (2006). Există o serie de teste de screening pentru evaluarea biodegradabilității aerobe a substanțelor organice [metodele de testare C.4, C.9, C.10, C.11 și (1) și Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 302 C (2)], iar rezultatele aplicării acestora au fost utilizate cu succes pentru a prevedea soarta substanțelor în mediul aerob, în special în etapele aerobe de tratare a apelor uzate. Diferite proporții de substanțe insolubile în apă, precum și ale celor care se adsorb pe solidele din apă uzată, sunt de asemenea tratate aerobic, întrucât ele sunt prezente în apă uzată decantată. Cu toate acestea, fracțiunile mai mari ale acestor substanțe sunt legate de nămol decantat primar, care este separat de nămolul brut în bazine de decantare înainte ca nămolul decantat sau supernatant să fie tratat aerobic. Nămolul, care conține o parte dintre substanțele solubile în lichidul interstițial, este apoi transmis către bazinele de fermentare încălzite pentru tratament anaerob. Deocamdată nu există teste în această serie pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe în bazine de fermentare anaerobă, iar acest test vizează remedierea acestei lacune; nu este în mod necesar aplicabil la alte compartimentele de mediu anoxice.
  
2. Tehnici respirometrice care măsoară cantitățile de gaze produse, în special metanul ( $\text{CH}_4$ ) și dioxidul de carbon ( $\text{CO}_2$ ), în condiții anaerobe au fost utilizate cu succes pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe. Birch et al. (3) a revizuit aceste proceduri și a concluzionat că activitatea realizată de Shelton și Tiedje (4), pe baza studiilor anterioare (5) (6) (7), a fost cea mai cuprinzătoare. Metoda (4), care a fost dezvoltat în continuare prin altele (8) și a fost inclusă în standardele americane (9) (10), nu a rezolvat problemele legate de solubilitățile diferite ale  $\text{CO}_2$  și  $\text{CH}_4$  în mediul de testare și de calculare a producției teoretice de gaz a unei substanțe testate. Raportul ECETOC (3) a recomandat măsurarea suplimentară a conținutului de carbon anorganic dizolvat (*dissolved inorganic carbon* – DIC) în lichidul supernatant, care a făcut ca tehnica să fie aplicabilă la scară mai largă. Metoda ECETOC a fost supusă unui exercițiu internațional de calibrare (sau test interlaboratoare) și a devenit standardul ISO 11734 (11).
  
3. Această metodă de testare, care se bazează pe ISO 11734 (11), descrie o metodă de screening pentru evaluarea potențialului de biodegradabilitate anaerobă a substanțelor organice în condiții specifice (de exemplu, într-un bazin de fermentare anaerobă la un moment dat și pentru un interval de concentrații ale microorganismelor). Întrucât un nămol diluat este utilizat la o concentrație relativ mare a substanței testate, iar durata testului este în general mai mare decât timpul de retenție în bazinele de fermentare anaerobă, condițiile de testare nu corespund în mod necesar condițiilor din bazinele de fermentare anaerobă și nici nu este aplicabil pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe a substanțelor organice în condiții de mediu diferite. Nămolul este expus la substanța testată până la 60 de zile, ceea ce este mai mult decât timpul normal de retenție a nămolului (25 – 30 de zile) în bazinele de fermentare anaerobă, deși în locațiile industriale timpul de retenție poate fi mult mai mare. Predicțiile din rezultatele acestui test nu pot fi făcute la fel de convingător ca în cazul biodegradării aerobe, întrucât dovezile acumulate cu privire la comportamentul substanțelor testate în testele aerobe „immediate” și în testele de simulare și în mediul aerobic sunt suficiente pentru a considera că există o legătură; există puține dovezi similare pentru mediul anaerob. Se poate presupune că



▼ **M6**

biodegradarea anaerobă completă apare dacă 75 % – 80 % din producția de gaze teoretică este atinsă. Rapoartele mari de substanță în raport cu biomasa utilizate în aceste teste înseamnă că o substanță care trece este mai probabil să fie degradată într-un bazin de fermentare anaerobă. În plus, substanțele care nu pot fi transformate în gaze în test nu persistă în mod necesar în condițiile unor rapoarte substanță-biomasă în mediu mai realiste. În plus, apar alte reacții anaerobe prin care substanțele pot fi cel puțin parțial degradate, de exemplu prin declorurare, dar acest test nu detectează astfel de reacții. Totuși, prin aplicarea unor metode analitice specifice pentru determinarea substanței testate, dispariția acesteia poate fi monitorizată (a se vedea punctele 6, 30, 44 și 53).

## PRINCIPIUL TESTULUI

4. Nămolul fermentat spălat<sup>(1)</sup>, care conține concentrații mici (< 10 mg/l) de carbon anorganic (*inorganic carbon* – IC), este diluat de aproximativ zece ori până la o concentrație totală a solidelor de 1 g/l – 3 g/l și se incubează la 35 °C ± 2 °C în vase închise ermetic, cu substanță testată la 20 – 100 mg C/l timp de maximum 60 de zile. Se realizează o ajustare pentru măsurarea activității nămolului prin utilizarea în paralel a unor martori de control cu inocul de nămol în mediu, dar fără substanța testată.
5. Se măsoară creșterea presiunii în spațiul neumplut al vaselor care rezultă din producerea de dioxid de carbon și metan. O mare parte a CO<sub>2</sub> produs va fi dizolvat în faza lichidă sau transformat în carbonat sau hidrogen carbonat în condițiile testului. Acest carbon anorganic este măsurat la sfârșitul testului.
6. Cantitatea de carbon (anorganic plus metan) care rezultă din biodegradarea substanței testate este calculată pe baza producției nete de gaze și a formării nete de IC în faza lichidă în exces față de valorile martorului de control. Amploarea biodegradării se calculează din IC total și C-metanice produse ca procent al cantității măsurate sau calculate a carbonului adăugat ca substanță testată. Evoluția biodegradării poate fi urmărită prin măsurări intermediare doar a producerii de gaze. În plus, biodegradarea primară poate fi determinată prin analize specifice la începutul și sfârșitul testului.

## INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

7. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de absorbție ale substanței testate. Conținutul de carbon organic (% G/G) al substanței testate trebuie să fie cunoscut, fie din structura sa chimică, fie prin măsurare. Pentru substanțele testate volatile, o constantă a legii lui Henry măsurată sau calculată ajută la stabilirea aplicabilității testului. Informațiile privind toxicitatea substanței testate pentru bacteriile anaerobe ajută la selectarea unei concentrații de testare corespunzătoare, precum și la interpretarea rezultatelor care indică o biodegradabilitate slabă. Se recomandă includerea unui control pentru inhibiție, cu excepția cazului în care se știe că substanța testată nu inhibă activitățile microbiene anaerobe [a se vedea punctul 21 și ISO 13641-1 (12)].

<sup>(1)</sup> Nămolul fermentat este un amestec de faze stabilizate de epurare și de nămol activat, care au fost incubate într-un bazin de fermentare anaerobă la aproximativ 35 °C pentru a reduce biomasa și problemele de miros și pentru a îmbunătăți capacitatea de eliminare a apei din nămol. El constă într-o asocieră de bacterii fermentative și metanogenice anaerobe producătoare de dioxid de carbon și de metan (11).

## ▼ M6

## APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE

8. Metoda de testare poate fi aplicată pentru substanțele solubile în apă; de asemenea, poate fi aplicată substanțelor greu solubile și insolubile, cu condiția să fie folosită o metodă de dozare exactă, de exemplu a se vedea ISO 10634 (13). În general pentru substanțele volatile este necesar ca deciziile să fie luate de la caz la caz. Trebuie luate măsuri speciale, de exemplu, neeliberarea de gaze pe durata testului.

## SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

9. Pentru a verifica procedura, se testează în paralel o substanță chimică de referință prin pregătirea unor vase corespunzătoare ca parte a testărilor normale. Fenolul, benzoatul de sodiu și polietilenglicol 400 sunt exemple și se preconizează că se vor degrada în proporție mai mare de 60 % din producția de gaz teoretică (adică metan și carbon anorganic) în 60 de zile (3) (14).

## REPRODUCIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

10. În cadrul unui test interlaboratoare (14) s-a constatat o bună reproductibilitate a măsurătorilor presiunii gazelor în vasele triplicate. Devierea standard relativă (coeficientul de variație, *coefficient of variation* – COV) a fost în principal sub 20 %, deși această valoare a crescut de multe ori la > 20 % în prezența substanțelor toxice sau spre finalul perioadei incubatie de 60 de zile. Deviațiile mai mari au fost constatate și în vasele cu volum < 150 ml. Valorile finale ale pH-ului mediului de testare au fost situate în intervalul 6,5 – 7.
11. Următoarele rezultate au fost obținute în testul interlaboratoare.

| Substanța testată    | Date totale<br>$n_1$ | Degradarea medie<br>(din datele totale)<br>(%) | Deviația standard relativă<br>(din datele totale)<br>(%) | Date valide<br>$n_2$ | Degradare medie<br>(din datele valabile)<br>(%) | Deviația standard relativă<br>(din datele valabile)<br>(%) | Date > 60 %<br>degradarea în<br>testele valide<br>$n_3$ |
|----------------------|----------------------|--|--|----------------------|---|--|---|
| Acid palmitic        | 36                   | 68,7 ± 30,7                                    | 45   | 27                   | 72,2 ± 18,8                                     | 26   | 19 = 70 % (*)   |
| Polietilenglicol 400 | 38                   | 79,8 ± 28,0                                    | 35   | 29                   | 77,7 ± 17,8                                     | 23   | 24 = 83 % (*)   |

(\*) Proportie de  $n_2$

12. Coeficienții de variație a mediei pentru toate valorile obținute cu acid palmitic și cu polietilenglicol 400 au fost de până la 45 % ( $n = 36$ ) și, respectiv, de 35 % ( $n = 38$ ). Atunci când valorile < 40 % și > 100 % au fost omise (prima fiind presupusă a fi cauzată de condițiile suboptimale, cea din urmă din motive necunoscute), cei doi COV au fost reduși la 26 % și, respectiv, la 23 %. Proporțiile valorilor „valide” care au atins o degradare de cel puțin 60 % au fost de 70 % pentru acidul palmitic și de 83 % pentru polietilenglicol 400. Proporțiile procentului de biodegradare obținute din măsurarea DIC au fost relativ mici, dar variabile. Pentru acidul palmitic, intervalul a fost de 0 – 35 %, media de 12 %, cu un COV de 92 %, iar pentru polietilenglicol 400 intervalul a fost de 0 – 40 %, media de 24 %, cu un COV de 54 %.

## DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

## Aparatură

13. Este necesară utilizarea echipamentelor obișnuite de laborator și a următoarelor:
- a. Incubator – fără risc de scântei și cu temperatură controlată de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

▼ **M6**

- b. Vase de testare – rezistente la presiune cu o dimensiunea nominală corespunzătoare<sup>(1)</sup>, fiecare prevăzut cu un sept impermeabil la gaze, capabil să suporte o presiune de aproximativ 2 bari. Volumul de spațiu neumplut trebuie să fie de aproximativ 10 % – 30 % din volumul total. Dacă biogazele sunt eliberate regulat, este adecvat un volum de spațiu neumplut de aproximativ 10 %, însă în cazul în care gazele sunt eliberate numai la sfârșitul testului, volumul de spațiu neumplut trebuie să fie de 30 %. Se recomandă utilizarea de flacoane de sticlă pentru ser cu un volum nominal de 125 ml și un volum total de aproximativ 160 ml, sigilate cu septuri pentru ser<sup>(2)</sup> și inele din aluminiu atunci când se eliberează presiunea în fiecare moment de prelevare;
- c. Un dispozitiv de măsurare a presiunii<sup>(3)</sup> adaptat pentru a permite măsurarea și ventilarea gazelor produse, de exemplu, manometru de precizie manual conectat la un ac de seringă adecvat; o supapă etanșă la gaze cu trei căi facilitează eliberarea presiunii în exces (apendicele 1). Este necesară menținerea volumului intern în tubulatură și supapa transductorului de presiune la un nivel cât mai mic posibil, astfel încât erorile introduse prin neluarea în considerare a volumului echipamentului să fie nesemnificative;

**Notă** – Citirile presiunii sunt utilizate direct pentru a calcula cantitatea de carbon produsă în spațiul neumplut (punctele 42 – 44). Ca alternativă, citirile presiunii pot fi convertite la volume (la 35 °C, presiune atmosferică) de gaze produse cu ajutorul unui grafic de conversie. Acest grafic este construit cu datele obținute prin injectarea unor volume cunoscute de azot gazos într-o serie de vase de testare (de exemplu, flacoane pentru ser) la 35 °C  $\pm$  2 °C și înregistrarea citirilor presiunii stabilizate rezultate (a se vedea appendicele 2). Modul de calculare este indicat în nota de la punctul 44.

**Avertisment** – Trebuie avut grijă să se evite leziunile cauzate de ace atunci când se utilizează microseringi.

- d. Analizor de carbon, adecvat pentru determinarea directă a carbonului anorganic în intervalul 1 mg/l – 200 mg/l;
- e. Seringi de precizie mare pentru eșantioanele gazoase sau lichide;
- f. Agitatoare magnetici și piese auxiliare (opțional);
- g. Cutie cu mănuși (recomandată).

**Reactivi**

14. Se utilizează întotdeauna reactivi cu puritate analitică.

<sup>(1)</sup> Dimensiunea recomandată este cuprinsă între 0,1 litri și 1 litru.

<sup>(2)</sup> Se recomandă utilizarea de septuri din silicon impermeabile la gaze. Se recomandă, de asemenea, testarea impermeabilității la gaze a dopurilor, în special a septurilor din cauciuc butilic, deoarece mai multe septuri disponibile pe piață nu sunt suficient de etanșe la metan, iar unele septuri nu rămân etanșe atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile testului.

<sup>(3)</sup> Dispozitivul trebuie utilizat și calibrat la intervale regulate, conform instrucțiunilor producătorului. În cazul în care este utilizat un manometru având calitatea necesară, de exemplu încapsulat cu o membrană din oțel, nu este necesară nicio calibrare în laborator. Acuratețea calibrării poate fi verificată în laborator cu o măsurătoare într-un singur punct la  $1 \times 10^5$  Pa în comparație cu un manometru cu afișare mecanică. Atunci când acest punct este măsurat corect, liniaritatea va fi, de asemenea, nealterată. În cazul utilizării altor dispozitive de măsurare (fără calibrare certificată de către producător), se recomandă calibrarea pentru întreg intervalul la intervale regulate.

▼ **M6****Apă**

15. Apă distilată sau deionizată (dezoxigenată prin barbotare cu azot gazos conținând sub 5 μl/l oxigen), care conține carbon organic dizolvat (DOC) într-o concentrație mai mică de 2 mg/l.

**Mediul de testare**

16. Mediul de diluție se prepară astfel încât să conțină următorii constituenți în cantitățile specificate:

|   |                 |
|---|-----------------|
| Fosfat diacid de potasiu anhidru ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0,27 g          |
| Fosfat acid disodic dodecahidrat [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ] | 1,12 g          |
| Clorură de amoniu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  | 0,53 g          |
| Clorură de calciu dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )                  | 0,075 g         |
| Clorură de magneziu hexahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )              | 0,10 g          |
| Clorură de fier(II) tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )             | 0,02 g          |
| Resazurin (indicator oxigen)  | 0,001 g         |
| Sulfură de sodiu nonahidrat ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )           | 0,10 g          |
| Soluții stoc de microelemente (opțional, punctul 18)                                      | 10 ml           |
| Se adaugă apa dezoxigenată (punctul 15)   | până la 1 litru |

*Notă:* Se utilizează sulfură de sodiu proaspăt obținută sau se spală și se usucă înainte de utilizare, pentru a se asigura că este suficient de reductoare. Testul poate fi efectuat fără a se utiliza o cutie cu mănuși (a se vedea punctul 26). În acest caz, concentrația finală a sulfurii de sodiu în mediu trebuie să fie crescută la 0,2 g de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  per litru. Sulfura de sodiu poate fi adăugată și dintr-o soluție stoc anaerobă corespunzătoare prin septul flacoanelor de testare închise, întrucât această procedură va reduce riscul de oxidare. Sulfura de sodiu poate fi înlocuită cu citrat de titan (III), care se adaugă prin septul flacoanelor de testare închise la o concentrație finală de 0,8 – 1 mmol/l. Citratul de titan (III) este un agent reductor foarte eficient și cu toxicitate mică, care este preparat după cum urmează: Se dizolvă 2,94 g de citrat trisodic dihidrat în 50 ml de apă dezoxigenată (rezultând o soluție de 200 mmol/l) și se adaugă 5 ml de soluție de clorură de titan (III) de 15 % (G/V). Se neutralizează la pH de  $7 \pm 0,2$  cu alcalin mineral și se distribuie într-un flacon corespunzător sub un curent de azot. Concentrația de citrat de titan (III) din această soluție stoc este de 164 mmol/l.

17. Se amestecă componentele mediului de testare cu excepția agentului reductor (sulfură de sodiu citrat de titan) și se barbotează soluția cu azot gazos timp de aproximativ 20 de minute imediat înainte de utilizare pentru a elimina oxigenul. Apoi se adaugă volumul adecvat de soluție proaspăt preparată de agent reductor (preparat în apă dezoxigenată) chiar înainte de utilizarea mediului. Se ajustează pH-ul mediului, dacă este necesar, cu acid sau alcalin mineral diluat la  $7 \pm 0,2$ .

**▼ M6****Soluțiile stoc de microelemente (opțional)**

18. Se recomandă ca mediul de testare să conțină următoarele microelemente pentru a îmbunătăți procesele de degradare anaerobă, în special dacă sunt utilizate concentrații mici (de exemplu 1 g/l) de inocul (11).

|   |                 |
|---|-----------------|
| Clorură de mangan tetrahidrat ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )       | 50 mg           |
| Acid boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )                                       | 5 mg            |
| Clorură de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ )   | 5 mg            |
| Clorură de cupru (II) ( $\text{CuCl}_2$ )   | 3 mg            |
| Molibdat disodic dihidrat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 1 mg            |
| Clorură de cobalt hexahidrat ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )        | 100 mg          |
| Clorură de nichel hexahidrat ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )        | 10 mg           |
| Selenit disodic ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )                                     | 5 mg            |
| Se adaugă apa dezoxigenată (punctul 15)   | până la 1 litru |

**Substanța testată**

19. Se adaugă substanța testată ca soluție, suspensie sau emulsie stoc sau direct în formă solidă sau lichidă sau ca substanță absorbită pe filtru cu fibre din sticlă pentru a obține o concentrație de carbon organic de maximum 100 mg/l. Dacă se utilizează soluții stoc, se prepară o soluție adecvată cu apă (punctul 15) (dezoxigenată în prealabil prin barbotare cu azot gazos) cu o astfel de concentrație încât volumul adăugat să fie mai mic de 5 % din volumul total al amestecului de reacție. Se ajustează pH-ul soluției stoc la  $\text{pH } 7 \pm 0,2$ , dacă este necesar. Pentru substanțele testate care nu sunt suficient de solubile în apă, a se consulta standardul ISO 10634 (13). Dacă se utilizează solvent, se prepară un control suplimentar, în mediul inoculat fiind adăugat numai solventul. A se evita solvenții organici precum cloroformul și tetracolorura de carbon, cunoscute ca fiind inhibitoare ale producției de metan.

Avertisment – A se manipula cu grijă substanțele testate toxice și cele ale căror proprietăți sunt necunoscute.

**Substanțe de referință**

20. Substanțe de referință, precum benzoatul de sodiu, fenolul și polietilen-glicol 400, au fost utilizate cu succes pentru a verifica procedura, fiind biodegradate în proporție de peste 60 % în 60 de zile. Se prepară o soluție stoc (în apă dezoxigenată) a substanței de referință alese în același mod ca pentru substanța testată și se ajustează la  $\text{pH } 7 \pm 0,2$ , dacă este necesar.

**Controlul pentru inhibiție (condițional)**

21. Pentru a obține informații privind toxicitatea substanței testate pentru microorganisme anaerobe pentru a găsi cea mai adecvată concentrație de testare, se adaugă substanța testată și substanța de referință într-un vas care conține mediul de testare (a se vedea punctul 16), fiecare la aceleași concentrații ca cele adăugate, respectiv [a se vedea punctele 19 și 20 și, de asemenea, ISO 13641-1 (12)].

▼ **M6****Nămolul fermentat**

22. Se colectează nămol fermentat dintr-un bazin de fermentare al unei stații de tratare a apelor uzate care tratează în special apele uzate menajere. Nămolul trebuie să fie caracterizat complet, iar informațiile de bază aferente trebuie raportate (a se vedea punctul 54). În cazul în care se intenționează utilizarea unui inocul adaptat, poate fi luată în considerare utilizarea de nămol fermentat provenit de la o stație de tratare a apelor uzate industriale. Pentru colectarea nămolului fermentat se utilizează flacoane cu gât larg fabricate din polietilenă cu densitate mare sau dintr-un material similar, care se pot dilata. Se introduce nămol în flacoane până la aproximativ 1 cm distanță de partea lor superioară și se închid ermetic, de preferință cu o supapă de siguranță. După transportul la laborator, nămolul colectat poate fi utilizat direct sau poate fi introdus într-un bazin de fermentare de laborator. Biogazele în exces se eliberează prin deschiderea cu atenție a flacoanelor cu nămol. În mod alternativ, nămolul anaerob cultivat în laborator poate fi utilizat ca sursă de inocul, însă spectrul de activitate al acestuia poate să fi fost redus.

Avertisment – Nămolul fermentat produce gaze inflamabile care prezintă risc de incendiu și de explozie: el conține și organisme potențial patogene, de aceea, trebuie luate măsuri de precauție corespunzătoare în momentul manipulării acestuia. Din motive de siguranță, a se evita utilizarea de vase din sticlă pentru colectarea nămolului.

23. Pentru a reduce producția de gaze de fond și pentru a reduce influența matorilor de control, poate fi luată în considerare fermentarea prealabilă a nămolului. În cazul în care fermentarea prealabilă este necesară, nămolul trebuie să poată fermenta fără adăugarea oricăror nutrienți sau substraturi la  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  timp de maximum 7 de zile. S-a constatat că fermentarea prealabilă timp de aproximativ 5 zile oferă, în mod uzual, o scădere optimă a producției de gaze a matorului fără creșteri inacceptabile ale perioadelor de latență sau de incubare în cursul fazei de testare sau pierdere de activitate în sensul unui număr mai mic de substanțe testate.
24. Pentru substanțele testate care sunt sau care se preconizează că sunt puțin biodegradabile, se ia în considerare preexpunerea nămolului la substanța testată pentru a obține un inocul care este mai bine adaptat. Într-un astfel de caz, substanța testată se adaugă la o concentrație de carbon organic de 5 – 20 mg/l la nămolul digerat și se incubează timp de până la 2 săptămâni. Înainte de utilizare, nămolul preexpus se spală cu grijă (a se vedea punctul 25), iar în raportul privind testul se indică condițiile preexpunerii.

**Inoculul**

25. Se spală nămolul (a se vedea punctele 22 – 24) chiar înainte de utilizare, pentru a reduce concentrația IC la mai puțin de 10 mg/l în suspensia finală de testat. Se centrifughează nămolul în eprubete închise ermetic (de exemplu, 3 000 g timp de 5 minute) și se elimină supernatantul. Se suspendă granulele rezultate în mediu dezoxigenat (punctele 16, 17), se centrifughează din nou suspensia și se elimină lichidul supernatant. În cazul în care IC nu a fost redusă suficient, procedura de spălare a nămolului se poate repeta de maximum două ori. Aceasta nu pare a avea un efect advers pentru microorganisme. În final, se suspendă granulele din volumul necesar de mediu de testare și se determină concentrația totală a solidelor [de exemplu, ISO 11923 (15)]. Concentrația finală a solidelor totale din vasele de testare trebuie să fie situată în intervalul 1 g/l – 3 g/l (sau aproximativ 10 % din cea a nămolului fermentat nediluat). Operațiunile descrise mai sus se execută astfel încât să se asigure nămolului un contact minim cu oxigenul (de exemplu, se utilizează o atmosferă de azot).

▼ **M6****PROCEDURA DE TESTARE**

26. Se efectuează următoarele proceduri inițiale folosind tehnici pentru a menține contactul dintre nămol fermentat și oxigen la un nivel cât mai mic posibil, de exemplu, poate fi necesar să se utilizeze o cutie cu mănuși într-o atmosferă de azot și/sau să se purjeze flacoanele cu azot (4).

**Pregătirea testării substanței de testat și a controalelor**

27. Se pregătesc câte cel puțin trei vase de testare (a se vedea punctul 13-b) pentru substanța testată, martorii de control, substanța de referință, controalele pentru inhibiție (condițional) și camerele de control al presiunii (procedură opțională) (a se vedea punctele 7, 19 – 21). Pot fi pregătite, de asemenea, vase suplimentare pentru evaluarea biodegradării primare folosind analize specifice substanței testate. Același set de martori de control poate fi folosit pentru mai multe substanțe testate în cadrul aceluiași test dacă volumele spațiului neumplut sunt concordante.
28. Se prepară inoculul diluat înainte de adăugarea acestuia în vase, de exemplu cu ajutorul unei pipete cu orificiu larg. Se adaugă alicote de inocul bine amestecat (punctul 25) astfel încât concentrația solidelor totale să fie aceeași în toate vasele (între 1 g/l și 3 g/l). Se adaugă soluții stoc ale substanțelor testate și de referință după ajustarea pH-ului la  $7 \pm 0,2$ , dacă este necesar. Substanța testată și substanța de referință trebuie să fie adăugate folosind cea mai adecvată cale de administrare (punctul 19).
29. Concentrația de testare a carbonului organic trebuie în mod normal să se situeze în intervalul 20 – 100 mg/l (punctul 4). Dacă substanța testată este toxică, concentrația de testare trebuie să fie redusă la 20 mg C/l sau chiar sub această valoare dacă se măsoară doar biodegradarea primară cu analize specifice. Trebuie remarcat faptul că variabilitatea rezultatelor testului crește la concentrații de testare mai mici.
30. Pentru vasele martor, se adaugă o cantitate echivalentă din cărașul utilizat pentru a doza substanța testată în locul unei soluții, suspensii sau emulsii stoc. Dacă substanța testată a fost administrată folosind filtre cu fibre din sticlă sau solvenți organici, martorilor li se adaugă un filtru sau un volum de solvent echivalent cu cel evaporat. Se pregătește o replică suplimentară cu substanță testată pentru măsurarea valorii pH-ului. Se ajustează pH-ul la  $7 \pm 0,2$ , dacă este necesar, cu mici cantități de acid sau alcalin mineral diluat. Aceleași cantități de agenți de neutralizare trebuie adăugate în toate vasele de testare. Aceste adăugări nu trebuie să fie necesar a fi efectuate deoarece valoarea pH-ului soluțiilor stoc ale substanței testate și ale substanței de referință au fost deja ajustate (a se vedea punctele 19 și 20). Dacă se măsoară biodegradarea primară, trebuie prelevat un eșantion adecvat din vasul de control al pH-ului sau dintr-un vas de testare suplimentar, iar concentrația substanței testate trebuie măsurată folosind analize specifice. În toate vasele pot fi adăugați magneți acoperiți dacă amestecurile de reacție trebuie agitate (opțional).
31. Se asigură că volumul total de lichid  $V_1$  și volumul spațiului neumplut  $V_h$  au aceeași valori în toate vasele; se notează și se înregistrează  $V_1$  și  $V_h$ . Fiecare vas trebuie să fie închis ermetic cu un sept impermeabil la gaze și transferat din cutia cu mănuși (a se vedea punctul 26) în incubator (a se vedea punctul 13-a).

## ▼ M6

**Substanțele testate insolubile**

32. Se adaugă cantități cântărite de substanțe greu solubile în apă direct în vasele pregătite. Dacă este necesară utilizarea unui solvent (a se vedea punctul 19), soluția sau suspensia substanței testate se transferă în vasele goale. Dacă este posibil, solventul se lasă să se evapore trecând azotul gazos prin vase și apoi se adaugă alte ingrediente, și anume, nămol fermentat (punctul 25) și apă dezoxigenată, după necesități. Trebuie să se pregătească, de asemenea, un vas suplimentar de control cu solvent (a se vedea punctul 19). Pentru alte metode de adăugare de substanțe insolubile, se poate consulta ISO 10634 (13). Substanțele testate lichide pot fi dozate cu ajutorul unei seringi în vasele complet pregătite închise ermetic, dacă se preconizează că pH-ul inițial nu va depăși  $7 \pm 1$ , în caz contrar se dozează astfel cum este descris mai sus (a se vedea punctul 19).

**Incubarea și măsurarea presiunii gazelor**

33. Vasele pregătite se lasă la incubat la  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  timp de aproximativ 1 oră pentru a permite echilibrarea și eliberarea gazelor în exces în atmosferă, de exemplu, prin agitarea fiecărui vas pe rând, inserând acul manometrului (punctul 13-c) prin dopul sigilant și deschizând supapa până când manometrul indică valoarea zero. Dacă în această etapă sau în momentul efectuării de măsurători intermediare, presiunea din spațiu neumplut este mai mică decât cea atmosferică, azotul gazos trebuie introdus pentru a restabili presiunea atmosferică. Se închide supapa (a se vedea punctul 13-c) și se continuă incubarea la întuneric, asigurându-se că toate părțile vaselor sunt menținute la temperatura de fermentare. Se observă vasele după incubare timp de 24 – 48 de ore. Vasele se resping în cazul în care conținutul lor prezintă o colorație roz distinctă în lichidul supernatant, de exemplu, dacă resazurinul (a se vedea punctul 16) și-a schimbat culoarea indicând prezența oxigenului (a se vedea punctul 50). În timp ce mici cantități de oxigen pot fi tolerată de către sistem, concentrațiile mai mari pot inhiba semnificativ evoluția biodegradării anaerobe. Respingerea ocazională a unui singur vas dintr-un set de trei vase poate fi acceptată, însă apariția mai multor eșecuri trebuie să conducă la o investigație a procedurilor experimentale, precum și la repetarea testului.
34. Conținutul fiecărui vas se amestecă cu atenție prin agitare timp de câteva minute de cel puțin 2 – 3 ori pe săptămână și imediat înainte de fiecare măsurare a presiunii. Agitarea resuspendă inoculul și asigură echilibrul gazos. Toate măsurătorile trebuie să fie efectuate cu rapiditate, deoarece vasele de testare pot face obiectul unei scăderi a temperaturii, conducând la valori false. În timpul măsurării presiunii, întregul vas de testare inclusiv spațiul neumplut trebuie să fie menținut la temperatura de fermentare. Se măsoară presiunea gazelor, de exemplu, prin inserarea prin sept a acului unei seringi (punctul 13-c) conectat la un aparat de monitorizare a presiunii. Trebuie avută grijă pentru a nu lăsa apa să pătrundă în acul de seringă; dacă acest lucru se întâmplă, părțile umede trebuie uscate și trebuie utilizat un ac nou. Presiunea trebuie să fie măsurată în milibari (a se vedea punctul 42). Presiunea gazelor din vase poate fi măsurată periodic, de exemplu în fiecare săptămână, și, în mod opțional, excesul de gaze este eliminat în atmosferă. Ca alternativă, presiunea este măsurată numai la sfârșitul testului pentru a determina cantitatea de biogaze produsă.
35. Se recomandă citiri intermediare ale presiunii gazelor, întrucât creșterea presiunii oferă orientări privind momentul în care testul poate fi încheiat și permite urmărirea cineticii (a se vedea punctul 6).



▼ **M6**

36. În mod normal, testul trebuie terminat după o perioadă de incubație de 60 de zile cu excepția cazului în care curba biodegradării obținută din măsurarea presiunii a atins faza de platou înainte; aceasta este faza în care a fost atins cel mai înalt grad de biodegradare și în care curba biodegradării s-a stabilizat. Dacă valoarea platoului este sub 60 % interpretarea este problematică deoarece ea indică faptul că numai o parte a moleculei a fost mineralizată sau că s-a comis o eroare. Dacă la sfârșitul perioadei de incubare, se produc gaze, dar faza de platou nu a fost în mod evident atinsă, trebuie luată în considerare prelungirea testului pentru a verifica dacă platoul (> 60 %) va fi atins.

**Măsurarea carbonului anorganic**

37. La sfârșitul testului după ultima măsurare a presiunii gazelor, nămolul trebuie lăsat să se decanteze. Se deschide fiecare vas pe rând și se prelevează imediat eșantioane pentru determinarea concentrației (mg/l) carbonului anorganic (IC) din lichidul supernatant. Nu trebuie să se recurgă nici la centrifugarea, nici la filtrarea lichidului supernatant, întrucât în acest caz ar exista o pierdere inacceptabilă de dioxid de carbon dizolvat. Dacă lichidul nu poate fi analizat în momentul prelevării de eșantioane, el se depozitează într-un flacon închis ermetic, fără spațiu neumplut și răcit la aproximativ 4 °C timp de 2 zile. După măsurarea IC, se măsoară și se înregistrează valoarea pH-ului.
38. Ca alternativă, IC în supernatant poate fi determinată indirect prin eliberarea IC dizolvat ca dioxid de carbon care poate fi măsurat în spațiul neumplut. După ultima măsurare a presiunii gazelor, se ajustează presiunea în fiecare dintre vasele de testare la presiunea atmosferică. Conținutul fiecărui vas se acidifică la un pH de aproximativ 1 prin adăugarea de acid mineral concentrat (de exemplu, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) prin septul vaselor închise ermetic. Vasele agitate se incubează la 35 °C ± 2 °C timp de aproximativ 24 de ore și se măsoară presiunea gazelor rezultate din dioxidul de carbon degajat folosind un manometru.
39. Se realizează citiri similare pentru vasele de control corespunzătoare cu martor, cu substanță de referință și, dacă sunt incluse, vasele de control pentru inhibiție (a se vedea punctul 21).
40. În unele cazuri, în special dacă aceleași vase de control sunt utilizate pentru mai multe substanțe testate, măsurătorile concentrațiilor IC intermediare în vasele de testare și în vasele de control trebuie luate în considerare, după caz. În acest caz, trebuie să se pregătească un număr suficient de vase pentru toate măsurătorile intermediare. Această procedură este preferată celei care implică prelevarea tuturor eșantioanelor dintr-un singur vas. Aceasta din urmă se poate realiza numai dacă volumul necesar pentru analiza DIC nu este considerat prea mare. Măsurarea DIC trebuie efectuată după măsurarea presiunii gazelor fără eliberarea gazelor în exces, astfel cum se descrie mai jos:
- se prelevează un volum cât mai mic de eșantioane de supernatant cu o seringă introdusă în sept fără a deschide vasele și se determină IC din eșantion;
  - după prelevarea eșantionului, gazele în exces sunt eliberate sau nu;
  - trebuie să se țină cont de faptul că chiar și o scădere mică a volumului supernatantului (de exemplu, de aproximativ 1 %) poate conduce la o creștere semnificativă a volumului de gaze în spațiul neumplut ( $V_h$ );
  - ecuațiile (a se vedea punctul 44) sunt corectate prin creșterea  $V_h$  în ecuația 3, după necesități.

**▼ M6****Analize specifice**

41. Dacă trebuie determinată degradarea anaerobă primară (a se vedea punctul 30), se prelevează un volum corespunzător de eșantion pentru analize specifice la începutul și la sfârșitul testului din vasele care conțin substanța testată. Dacă aceasta este realizată, este de remarcat faptul că volumele spațiului neumplut ( $V_h$ ) și de lichid ( $V_l$ ) vor fi modificate, acest fenomen trebuind a fi luat în considerare la calcularea rezultatelor producerii de gaze. Ca alternativă, se pot preleva eșantioane pentru analize specifice din amestecuri suplimentare pregătite anterior în acest scop (punctul 30).

**DATE ȘI RAPORTARE****Tratamentul rezultatelor**

42. Din considerente practice, presiunea gazelor se măsoară în milibari ( $1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^5 \text{ Pa}$ ;  $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$ ), volumul în litri și temperatura în grade Celsius.

**Carbonul din spațiul neumplut**

43. Întrucât 1 mol de metan și 1 mol de dioxid de carbon conțin fiecare 12 g de carbon, masa carbonului dintr-un volum dat de gaze degajate poate fi exprimată ca:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ecuația [1]}$$

unde:

$m$  = masa carbonului (mg) într-un volum dat de gaze degajate;

12 = masa atomică relativă a carbonului;

$n$  = numărul de moli de gaz dintr-un volum dat.

Dacă un gaz, altul decât metanul sau dioxidul de carbon (de exemplu,  $\text{N}_2\text{O}$ ) este generat în cantități considerabile, formula [1] trebuie modificată pentru a descrie posibilitatea efectelor gazelor generate.

44. Conform legilor gazelor,  $n$  poate fi exprimat ca:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ecuația [2]}$$

unde:

$p$  = presiunea gazelor (Pascali);

$V$  = volumul gazului ( $\text{m}^3$ );

$R$  = constanta molară a gazelor [ $8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$ ];

$T$  = temperatura de incubare (Kelvin).

Prin combinarea ecuațiilor [1] și [2] și raționalizare pentru a ajusta în raport cu producția de gaze în martorul de control:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ecuația [3]}$$

unde:

$m_h$  = masa de carbon net produs ca gaz în spațiul neumplut (mg);

$\Delta p$  = media diferențelor dintre presiunea inițială și cea finală în vasele de testare minus media corespunzătoare în vasele martor (milibari);

**▼ M6**

$V_h$  = volumul de spațiu neumplut din vas (l);

0,1 = conversia pentru newtoni/m<sup>2</sup> în milibari și m<sup>3</sup> în litri.

Ecuția [4] trebuie utilizată pentru temperatura normală de incubare de 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Ecuția [4]}$$

*Notă:* Calcularea alternativă a volumului. Citirile manometrului sunt convertite în ml de gaze produse folosind curba standard generată prin trasarea volumului (ml) injectat versus valoarea măsurată (apendicele 2). Numărul de moli (n) de gaz în spațiul neumplut din fiecare vas este calculat prin împărțirea producției cumulate de gaze (ml) la 25 286 ml/mol, care reprezintă volumul ocupat de un mol de gaz la 35 °C și presiunea atmosferică standard. Întrucât 1 mol de CH<sub>4</sub> și 1 mol de CO<sub>2</sub> conține fiecare 12 g de carbon, cantitatea de carbon (mg) din spațiul neumplut ( $m_h$ ) este dată de ecuația [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ecuția [5]}$$

Raționalizare pentru a ajusta în raport cu producția de gaze în martorul de control:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad \text{Ecuția [6]}$$

unde:

$m_h$  = masa de carbon net produs ca gaz în spațiul neumplut (mg);

$\Delta V$  = media diferenței dintre volumul de gaze produse în spațiul neumplut din vasele de testare și din vasele de control martor;

25286 = volumul ocupat de 1 mol de gaz la 35 °C, 1 atmosferă.

45. Evoluția biodegradării poate fi urmărită prin trasarea unei curbe a creșterii presiunii cumulate  $\Delta p$  (milibari) în funcție de timp, dacă este cazul. Din această curbă, se identifică și se înregistrează faza de latență (zile). Faza de latență este intervalul de timp de la începutul testului până la începerea degradării semnificative (de exemplu, a se vedea apendicele 3). Dacă au fost prelevate și analizate eșantioane intermediare de supernatant (a se vedea punctele 40, 46 și 47), atunci C total produs (în gaze plus în lichid) poate fi trasat grafic în loc de a trasa doar presiunea cumulată.

**Carbonul din lichid**

46. Cantitatea de metan din lichid este ignorată întrucât solubilitatea sa în apă este cunoscută ca fiind foarte mică. Masa carbonului anorganic din lichidul din vasele de testare se calculează folosind ecuația [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Ecuția [7]}$$

unde:

$m_l$  = masa de carbon anorganic din lichid (mg);

$C_{net}$  = concentrația de carbon anorganic din vasele de testare minus cea din vasele de control la sfârșitul testului (mg/l);

$V_l$  = volumul de lichid din vas (l).

**▼ M6****Carbon gazificat total**

47. Masa totală a carbonului gazificat din vas se calculează folosind ecuația [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Ecuația [8]}$$

unde:

$m_t$  = masa totală a carbonului gazificat (mg);

$m_h$  și  $m_l$  sunt definite mai sus.

**Carbonul din substanța testată**

48. Masa de carbon din vasul de testare derivat din substanța testată adăugată se calculează folosind ecuația [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Ecuația [9]}$$

unde:

$m_v$  = masa carbonului din substanța testată (mg);

$C_c$  = concentrația carbonului din substanța testată din vasul de testare (mg/l)

$V_l$  = volumul de lichid din vasul de testare (l).

**Amploarea biodegradării**

49. Procentul de biodegradare a gazelor din spațiul neumplut se calculează folosind ecuația [10], iar procentul total al biodegradării se calculează folosind ecuația [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Ecuația [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Ecuația [11]}$$

unde:

$D_h$  = biodegradarea gazelor din spațiul neumplut ( %);

$D_t$  = biodegradarea totală ( %);

$m_h$ ,  $m_v$  și  $m_t$  sunt definite mai sus.

Amploarea biodegradării primare este calculată din (opțional) măsurătorile concentrației substanței testate la începutul și sfârșitul incubării, utilizând ecuația [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Ecuația [12]}$$

unde:

$D_p$  = degradarea primară a substanței testate ( %);

$S_i$  = concentrația inițială a substanței testate (mg/l);

$S_e$  = concentrația substanței testate la sfârșit (mg/l).

Dacă metoda de analiză indică concentrații semnificative ale substanței testate în inoculul de nămol anaerob nemodificat, se folosește ecuația [13]:

**▼ M6**

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ecuația [13]}$$

unde:

$D_p^1$  = degradarea primară corectată a substanței testate ( %);

$S_{ib}$  = concentrația inițială „aparentă” a substanței testate în martorii de control (mg/l);

$S_{eb}$  = concentrația „aparentă” a substanței testate în controalele martor la final (mg/l).

**Validitatea rezultatelor**

50. Citirile presiunii trebuie utilizate numai din vasele care nu prezintă o colorație roz (a se vedea punctul 33). Contaminarea cu oxigen este redusă la minimum prin utilizarea unor tehnici de manipulare anaerobe corespunzătoare.
51. Trebuie să se aibă în vedere faptul că testul este valid dacă substanțele de referință ating un platou ce reprezintă biodegradare peste 60 % <sup>(1)</sup>.
52. Dacă la sfârșitul testului pH-ul a depășit intervalul de  $7 \pm 1$  și dacă a avut loc o biodegradare insuficientă, testul se repetă cu o capacitate de tamponare crescută a mediului.

**Inhibarea degradării**

53. Producerea de gaze în vasele care conțin atât substanțe testată, cât și substanțe de referință, trebuie să fie cel puțin egală cu cea din vasele care conțin numai substanțe de referință; în caz contrar, se indică inhibarea producerii de gaze. În unele cazuri, producția de gaze în vasele care conțin substanța testată fără substanță de referință va fi mai mică decât cea din martorii de control, indicând faptul că substanța testată este inhibitorie.

**Raportul privind testul**

54. Raportul privind testul trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța testată:*

- denumire comună, denumire chimică, număr CAS, formulă structurală și proprietăți fizico-chimice relevante;
- puritatea (impurități) substanței testate.

*Condiții de testare:*

- volumele lichidului fermentat diluat ( $V_l$ ) și al spațiului neumplut ( $V_h$ ) din vas;
- descrierea vaselor de testare, a principalelor caracteristici ale măsurării biogazelor (de exemplu, tipul de manometru) și a analizorului IC;
- aplicarea substanței testate și a substanței de referință la sistemul de testare: concentrațiile de testare utilizate și utilizarea oricăror solvenți;
- detalii privind inoculul utilizat: denumirea stației de tratare a apelor uzate, descrierea sursei apelor uzate tratate (de exemplu, temperatura de operare, timpul de retenție a nămolului, în cea mai mare parte din apele uzate menajere), concentrația, orice informație necesară pentru a confirma acestea și informații privind orice pretratament al inoculului (de exemplu, prefermentare, preexponere);
- temperatura de incubare;
- numărul de replici.

<sup>(1)</sup> Aceasta necesită reevaluare dacă sunt incluse substanțe chimice absorbante și insolubile.

▼ **M6***Rezultate:*

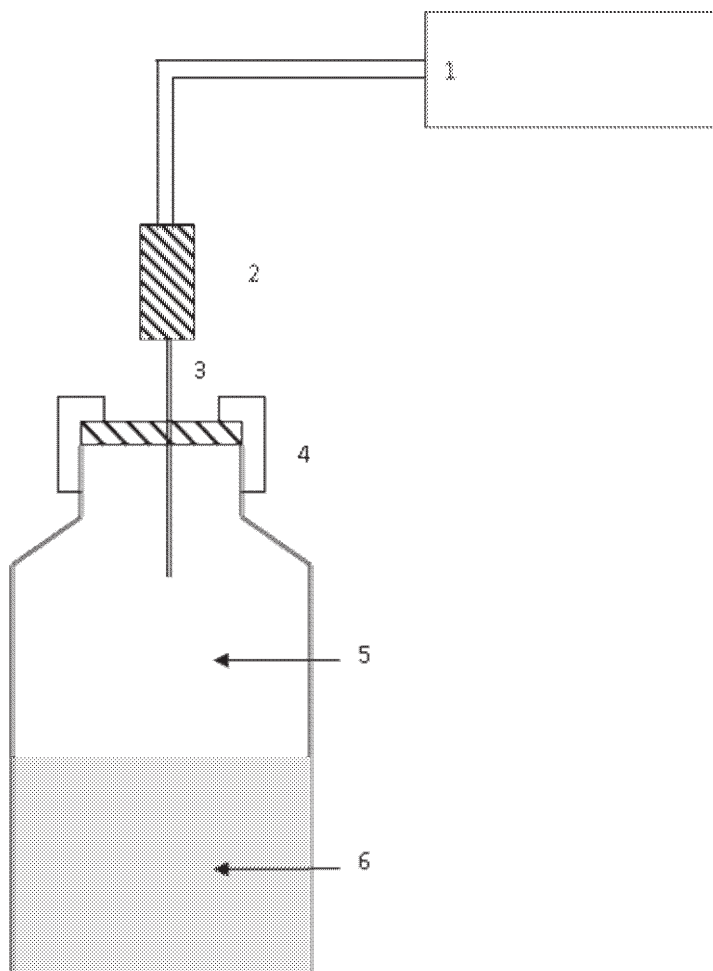
- valorile pH și IC la sfârșitul testului;
- concentrația substanței testate la începutul și la sfârșitul testului, dacă a fost efectuată o măsurare specifică;
- toate datele măsurate colectate pentru vasele cu substanță testată, martor, substanță de referință și de control pentru inhibiție, după caz [de exemplu, presiunea în milibari, concentrația de carbon anorganic (mg/l) sub formă de tabel (datele măsurate pentru spațiul neumplut și lichid trebuie raportate separat);]
- tratarea statistică a datelor, durata testului și o diagramă a biodegradării substanței testate, a substanței de referință și a controlului inhibiției;
- procentul biodegradării substanței testate și a substanței de referință;
- motivele oricărei respingeri a rezultatelor testului;
- discutarea rezultatelor.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) The following chapters of this Annex:
  - C.4, Determination of Ready Biodegradability;
  - C.9, Biodegradation – Zahn-Wellens Test;
  - C.10, Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment:
  - A: Activated Sludge Units, B: Biofilms
  - C.11, Biodegradation – Activated sludge respiration inhibition
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* **19**, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, **47**, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* **13**, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, **17**, 2441-2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

**▼ M6**

- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
- (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
- (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 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.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6***Apendicele 1***Exemplu de aparatură de măsurare a producerii de gaze prin presiunea gazelor***Legendă:*

- 1 – Manometru
- 2 – Supapă etanșă pentru gaze cu trei căi
- 3 – Ac de seringă
- 4 – Capac etanș pentru gaze (dop ambutisat și sept)
- 5 – Spațiu neumplut ( $V_h$ )
- 6 – Inocul de nămol fermentat ( $V_f$ )

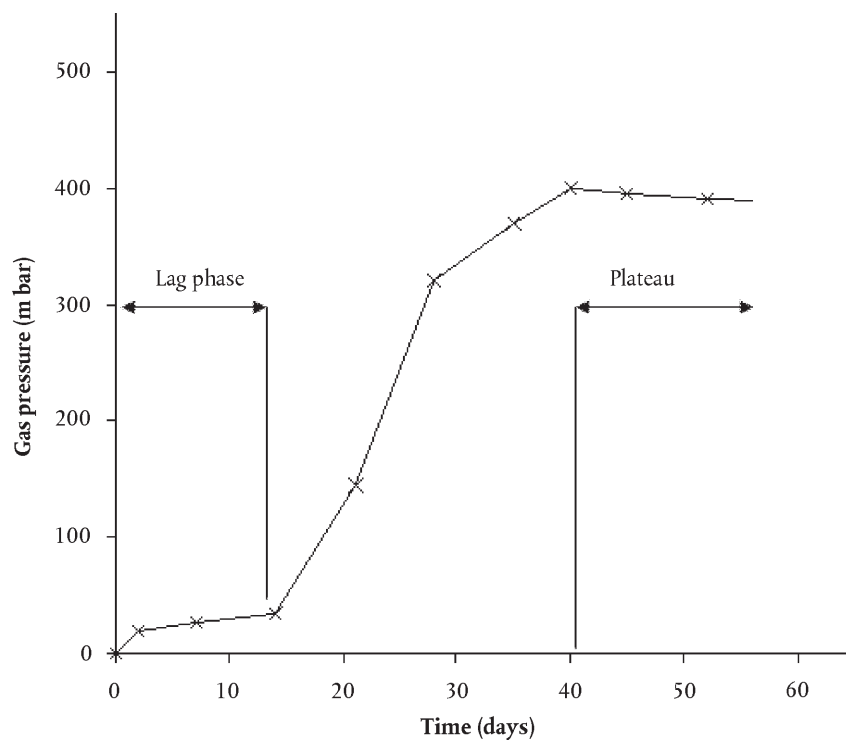
Vase de testare într-un mediu cu o temperatură de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



**▼ M6***Apendicele 2***Conversia manometrului**

Citirile manometrului pot fi raportate la volumele de gaze cu ajutorul unei curbe standard realizate prin injectarea de volume de aer cunoscute la  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în flacoane pentru ser care conțin un volum de apă egal cu cel al amestecului de reacție,  $V_R$ :

- Se repartizează alicote  $V_R$  ml de apă, ținute la temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în cinci flacoane pentru ser. Se sigilează flacoanele și se așează într-o baie de apă la temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  timp de 1 oră pentru echilibrare;
- Se pornește manometrul, se lasă să se stabilizeze și se ajustează la zero;
- Se introduce acul seringii prin septul unuia dintre flacoane, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și se închide supapa;
- Se repetă procedura cu restul flacoanelor;
- Se injectează 1 ml de aer la temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  în fiecare flacon. Se introduce acul (pe manometru) prin septul unuia dintre flacoane și se așteaptă stabilizarea presiunii. Se înregistrează presiunea, se deschide supapa până ce presiunea este zero și apoi se închide supapa;
- Se repetă procedura cu restul flacoanelor;
- Se repetă întreaga procedură de mai sus utilizând 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml și 50 ml de aer;
- Se trasează o curbă de conversie a presiunii (Pa) în funcție de volumul de gaz injectat  $V_b$  (ml). Răspunsul instrumentului este linear în intervalul 0 Pa – 70 000 Pa și 0 ml – 50 ml de producție de gaze.

▼ **M6***Apendicele 3***Exemplu de curbă de degradare (creștere cumulativă a presiunii nete )**

## Exemplu de fișe de date pentru testul de biodegradare anaerobă – fișă de date pentru substanța testată

Laborator: ..... Substanța testată: ..... Test nr.: .....

Temperatură de testare (°C): ..... Volumul spațiului neumplut ( $V_h$ ): .....(l) Volumul de lichid ( $V_l$ ): .....(l)Carbon în substanța testată  $C_{C,V}$ : .....(mg/l)  $m_v$  <sup>(1)</sup>: .....(mg)

| Ziua         | $p_1$ (test)<br>(mbar)      | $p_2$ (test)<br>(mbar)      | $p_3$ (test)<br>(mbar)      | $p$ (test)<br>medie<br>(mbar)            | $p_4$ (martor)<br>(mbar)      | $p_5$ (martor)<br>(mbar)      | $p_6$ (martor)<br>(mbar)      | $p$ (martor)<br>medie<br>(mbar)            | $p$ (net)<br>test – martor<br>medie (mbar)      | $\Delta p$ (net)<br>Cumulat<br>(mbar)    | $m_h$<br>spațiu<br>neumplut C <sup>(2)</sup><br>(mg) | $D_h$<br>Biodegra-<br>dare <sup>(3)</sup><br>(%) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|---|--|--|--|
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
|              | $C_{IC, 1}$<br>test<br>(mg) | $C_{IC, 2}$<br>test<br>(mg) | $C_{IC, 3}$<br>test<br>(mg) | $C_{IC}$<br>media pentru<br>test<br>(mg) | $C_{IC, 4}$<br>martor<br>(mg) | $C_{IC, 5}$<br>martor<br>(mg) | $C_{IC, 6}$<br>martor<br>(mg) | $C_{IC}$<br>media pentru<br>martor<br>(mg) | $C_{IC, net}$<br>test – martor<br>medie<br>(mg) | $m_l$<br>lichid C <sup>(4)</sup><br>(mg) | $m_t$<br>C total <sup>(5)</sup><br>(mg)              | $D_t$<br>Biodegra-<br>dare <sup>(6)</sup><br>(%) |
| IC (sfârșit) |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |
| pH (sfârșit) |                             |                             |                             |  |                               |                               |                               |  |   |  |  |  |

<sup>(1)</sup> Carbon în vasul de testare,  $m_v$  (mg):  $m_v = C_{C,v} \times V_l$ <sup>(2)</sup> Carbon în spațiul neumplut,  $m_h$  (mg) la temperatură de incubare normală (35 °C):  $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$ <sup>(3)</sup> Biodegradarea calculată din gazele din spațiul neumplut,  $D_h$  (%):  $D_h = (m_h \times 100)/m_v$ <sup>(4)</sup> Carbon în lichid,  $m_l$  (mg):  $m_l = C_{IC,net} \times V_l$ <sup>(5)</sup> Carbon gazificat total,  $m_t$  (mg):  $m_t = m_l$ <sup>(6)</sup> Biodegradarea totală,  $D_t$  (%):  $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

## ▼ M6

Laborator: ..... Substanță de referință: ..... Test nr.: .....

Temperatură de testare (°C): ..... Volumul spațiului neumplut ( $V_h$ ): .....(l) Volumul de lichid ( $V_l$ ) (litri): .....

Carbon în substanța de referință  $C_{c,v}$  (mg/l): .....  $m_v$  <sup>(1)</sup> (mg):

| Ziua         | $p_1$ (ref.)<br>(mbar)      | $p_2$ (ref.)<br>(mbar)      | $p_3$ (ref.)<br>(mbar)      | $p$ (ref.)<br>medie<br>(mbar)  | $p_4$ (inhib.)<br>(mbar)      | $p_5$ (inhib.)<br>(mbar)      | $p_6$ (inhib.)<br>(mbar)      | $p$ (inhib.)<br>medie<br>(mbar)  | $p$ (ref.)<br>ref. – martor<br>(mbar)  | $\Delta p$ (ref.)<br>cumulativ<br>(mbar) | $m_h$<br>spațiu<br>neumplut C <sup>(2)</sup><br>(mg) | $D_h$<br>Biodegra-<br>dare <sup>(3)</sup><br>(%) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|--|--|--|
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
|              | $C_{IC, 1}$<br>ref.<br>(mg) | $C_{IC, 2}$<br>ref.<br>(mg) | $C_{IC, 3}$<br>ref.<br>(mg) | $C_{IC}$<br>medie ref.<br>(mg) | $C_{IC, 4}$<br>inhib.<br>(mg) | $C_{IC, 5}$<br>inhib.<br>(mg) | $C_{IC, 6}$<br>inhib.<br>(mg) | $C_{IC}$<br>medie inhib.<br>(mg) | $C_{IC, net}$<br>ref. – inhib.<br>(mg) | $m_l$<br>lichid C <sup>(4)</sup><br>(mg) | $m_t$<br>C total <sup>(5)</sup><br>(mg)              | $D_t$<br>Biodegra-<br>dare <sup>(6)</sup><br>(%) |
| IC (sfârșit) |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |
| pH (sfârșit) |                             |                             |                             |                                |                               |                               |                               |                                  |  |  |  |  |

<sup>(1)</sup> Carbon în vasul de testare,  $m_v$  (mg):  $m_v = C_{c,v} \times V_l$

<sup>(2)</sup> Carbon în spațiul neumplut,  $m_h$  (mg) la temperatură de incubare normală (35 °C):  $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

<sup>(3)</sup> Biodegradarea calculată din gazele din spațiul neumplut,  $D_h$  (%):  $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

<sup>(4)</sup> Carbon în lichid,  $m_l$  (mg):  $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

<sup>(5)</sup> Carbon gazificat total,  $m_t$  (mg):  $m_t = m_l + m_h$

<sup>(6)</sup> Biodegradarea totală,  $D_t$  (%):  $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼ **M6****C.44. PERCOLARE ÎN COLOANE DE SOL****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 312 (2004). Substanțele chimice sintetice pot ajunge în sol direct prin aplicare deliberată (de exemplu, substanțe agrochimice) sau prin căi indirecte (de exemplu, prin ape reziduale nămol de epurare sol sau aer depuneri umede/uscate). Pentru evaluarea riscului acestor substanțe chimice, este important să se estimeze potențialul lor de transformare în sol și de migrare (percolare) în straturile mai profunde ale solului și, în cele din urmă, în apele subterane.
2. Mai multe metode sunt disponibile pentru a măsura potențialul de percolare al substanțelor chimice în sol în condiții de laborator controlate și anume cromatografie în strat subțire de sol, cromatografie în strat gros de sol, cromatografie în coloană de sol și măsurători ale adsorbției – desorbției (1) (2). Pentru substanțele chimice neionizate, coeficientul de partiție n-octanol-apă ( $P_{ow}$ ) permite o estimare timpurie a potențialului lor de absorbție și de percolare (3)(4)(5).
3. Metoda descrisă în această metodă de testare se bazează pe cromatografie în coloană de sol cu sol perturbat (a se vedea apendicele 1 pentru definiție). Se efectuează două tipuri de experimente pentru a determina (i) potențialul de percolare al substanței testate și (ii) potențialul de percolare al produșilor de transformare (studiu cu reziduuri învechite) în soluri în condiții de laborator controlate<sup>(1)</sup>. Metoda de testare se bazează pe metodele existente (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestei metode de testare au fost convenite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor, care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (12). De asemenea, el a formulat o serie de recomandări cu privire la colectarea, manipularea și depozitarea eșantioanelor de sol pentru experimente de percolare.

**PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

5. Coloane fabricate din material inert adecvat (de exemplu, sticlă, oțel inoxidabil, aluminiu, teflon, PVC etc.) sunt umplute cu sol și apoi saturate și echilibrate cu o soluție de „ploaie artificială” (pentru definiție a se vedea apendicele 1) și se lasă să se dreneze. Ulterior, suprafața fiecărei coloane de sol este tratată cu substanța chimică testată și/sau cu reziduuri învechite ale substanței chimice testate. Apoi ploaia artificială este aplicată în coloanele de sol și se colectează percolatul. După procesul de percolare, solul este eliminat din coloane și este secționat într-un număr corespunzător de segmente în funcție de informațiile urmărite prin studiu. Fiecare segment de sol și percolatul sunt apoi analizate în ceea ce privește substanța chimică testată și, dacă este cazul, produșii de transformare sau alte substanțe chimice de interes.

**APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE**

6. Metoda de testare este aplicabilă pentru testarea substanțelor chimice (nemarcate sau marcate radioactiv: de exemplu cu  $^{14}\text{C}$ ) pentru care există o metodă analitică cu acuratețe și sensibilitate suficiente. Metoda de testare nu trebuie să se aplice substanțelor chimice care sunt volatile din sol și apă și, prin urmare, care nu rămân în sol și/sau în percolat în condițiile experimentale ale acestei metode de testare.

**INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ**

7. Substanțele chimice testate nemarcate sau marcate radioactiv pot fi folosite pentru a măsura comportamentul de percolare în coloanele de sol. Materialele marcate radioactiv sunt necesare pentru a studia percolarea produșilor de transformare (reziduuri învechite ale substanței chimice testate) și pentru a determina bilanțul masic. Este recomandată marcarea

<sup>(1)</sup> Studiile percolării în coloană cu produse fitosanitare pot furniza informații legate de mobilitate cu privire la o substanță chimică testată și la produșii ei de transformare și poate completa studiile de absorbție cu loturi.

**▼ M6**

cu  $^{14}\text{C}$ , dar pot fi utili și alți izotopi precum  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ . Pe cât posibil, marcarea ar trebui făcută în porțiunea sau porțiunile cele mai stabile ale moleculei. Puritya substanței chimice testate trebuie să fie de cel puțin 95 %.

8. Cele mai multe substanțe chimice trebuie să fie aplicate ca substanță unică. Cu toate acestea, în cazul substanțelor active din produsele fitosanitare, pot fi utilizate produse formulate pentru a studia percolarea substanței testate parentale, însă testarea lor este necesară în special atunci când amestecul poate afecta viteza de eliberare (de exemplu, formulările granulare sau cu eliberare controlată). În ceea ce privește cerințele specifice amestecurilor pentru protocolul de testare, ar putea fi utilă consultarea autorității de reglementare înainte de efectuarea testului. Pentru studiile percolării reziduurilor învechite, trebuie utilizată substanța testată parentală pură.

9. Înainte de efectuarea unor teste de percolare în coloanele de sol, este de preferat să fie disponibile următoarele informații privind substanța chimică testată:

- (1) solubilitatea în apă [metoda de testare A.6] (13);
- (2) solubilitatea în solvenți organici;
- (3) presiunea de vapori [metoda de testare A.4] (13) și constanta legii lui Henry;
- (4) coeficientul de partiție n-octanol/apă [metodele de testare A.8 și A.24 ] (13);
- (5) coeficientul de absorbție ( $K_d$ ,  $K_f$  sau  $K_{OC}$ ) [metodele de testare C.18 și/sau C.19] (13);
- (6) hidroliza [metoda de testare C.7] (13);
- (7) constanta de disociere ( $pK_a$ ) [OCDE TG 112] (25);
- (8) transformarea aerobă și anaerobă în sol [metoda de testare C.23] (13)

*Notă:* Temperatura la care au fost efectuate aceste măsurători trebuie raportată în rapoartele respective privind testele.

10. Cantitatea de substanță chimică testată aplicată coloanelor de sol trebuie să fie suficientă pentru a permite detectarea a cel puțin 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment. Pentru substanțele chimice active din produsele fitosanitare, cantitatea de substanță chimică testată aplicată poate corespunde ratei de utilizare recomandate maxime (o singură aplicare).
11. Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică adecvată cu acuratețe, precizie și sensibilitate cunoscute, pentru a cuantifica substanța chimică testată și, dacă este relevant, produșii ei de transformare în sol și în percolat. De asemenea, ar trebui să fie cunoscută limita de detecție analitică pentru substanța chimică testată și pentru produșii ei de transformare semnificativi (în mod normal, cel puțin toți produșii de transformare  $\geq 10$  % din doza aplicată observați în studiile privind căile de transformare, dar de preferință, orice produs de transformare relevant de interes) (a se vedea punctul 17).

**▼ M6****SUBSTANȚELE CHIMICE DE REFERINȚĂ**

12. Substanțele chimice de referință cu un comportament de percolare cunoscut, precum atrazina sau monuronul, care pot fi considerați percolatori moderați în teren trebuie folosite pentru a evalua mobilitatea relativă în sol a substanței chimice testate (1)(8)(11). O substanță chimică de referință polară neabsorbantă și nedegradabilă (de exemplu, tritiu, bromură, fluoresceină, eozină) pentru a trasa mișcarea apei în coloană poate, de asemenea, să fie utilă pentru confirmarea proprietăților hidrodinamice ale coloanei de sol.
13. Substanțele chimice standard analitice pot fi, de asemenea, utile pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare găsiți în segmentele de sol și în segmentele de percolat prin metode cromatografice, spectroscopice sau prin alte metode relevante.

**DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI**

14. A se vedea apendicele 1.

**CRITERII DE CALITATE****Recuperarea**

15. Suma procentelor de substanță chimică testată găsite în segmentele de sol și în percolatul din coloană după percolare redă recuperarea pentru un experiment de percolare. Recuperările trebuie să varieze între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate radioactiv (11) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate (8).

**Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

16. Repetabilitatea metodei analitice pentru a cuantifica substanța chimică testată și produșii de transformare pot fi verificate prin analize duplicate a aceluiași extract dintr-un segment de sol sau din percolat (a se vedea punctul 11).
17. Limita de detecție (*limit of detection* – LOD) a metodei de analiză pentru substanța chimică testată și pentru produșii de transformare trebuie să fie de cel puțin  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  în fiecare segment de sol sau în percolat (ca substanță chimică testată) sau 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment, oricare dintre acestea este mai mică. Se specifică și limita de cuantificare (*limit of quantification* – LOQ).

**DESCRIEREA METODEI DE TESTARE****Sistemul de testare**

18. Coloanele de percolare (secționabile sau neseționabile) fabricate din material inert adecvat (de exemplu, sticlă, oțel inoxidabil, aluminiu, teflon, PVC etc.), cu un diametru interior de cel puțin 4 cm și o înălțime minimă de 35 cm sunt utilizate pentru test. Materiale coloanei trebuie să fie testate din punctul de vedere al potențialelor interacțiuni cu substanța chimică testată și/sau cu produșii ei de transformare. Exemple de coloane secționabile sau neseționabile adecvate sunt prezentate în apendicele 2.
19. Pentru umplerea coloanelor de sol se folosesc cupe, plonjoare și vibratoare.
20. Pentru aplicarea ploi artificiale în coloanele de sol, pot fi utilizate pompe cu piston sau peristaltice, capete de duș, flacoane Mariotte sau simple pâlnii de picurare.

**▼ M6****Echipamente de laborator și substanțe chimice**

21. Este necesar echipament de laborator standard, care să cuprindă, în particular, următoarele:
- (1) instrumente de analiză cum sunt: echipamente pentru GLC, HPLC și TLC, inclusiv sisteme adecvate de detecție pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a celor nemarcate sau metoda diluției izotopice inverse;
  - (2) instrumente de identificare (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR etc.);
  - (3) contor cu lichid de scintilație pentru substanțele chimice marcate radioactiv;
  - (4) oxidant pentru combustia materialelor marcate;
  - (5) aparat de extracție (de exemplu eprubete de centrifugare pentru extracția la rece și aparat Soxhlet pentru extracția continuă sub reflux);
  - (6) instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a extractelor (de exemplu, evaporator rotativ);
22. Substanțele chimice utilizate includ: solvenți organici, reactivi de puritate analitică, precum acetona, metanolul etc.; lichid de scintilație; soluție 0,01 M CaCl<sub>2</sub> în apă distilată sau deionizată (= ploaie artificială).

**Substanța chimică testată**

23. Pentru a aplica substanța chimică testată în coloana de sol, aceasta trebuie dizolvată în apă (deionizată sau distilată). Dacă substanța chimică testată este puțin solubilă în apă, acesta poate fi aplicată fie ca produs formulat (dacă este necesar, după suspendare sau emulsifiere în apă), fie în orice solvent organic. În cazul în care se utilizează un solvent organic, acesta trebuie să fie utilizat la minimum și trebuie evaporat de pe suprafața coloanei de sol înainte de a începe procedura de percolare. Formulările solide, precum granulele, trebuie să fie aplicate sub formă solidă fără apă; pentru a permite o mai bună distribuție pe suprafața coloanei de sol, produsul formulat poate fi amestecat cu o cantitate mică de nisip de cuarț (de exemplu 1 g) înainte de aplicare.
24. Cantitatea de substanță chimică testată aplicată coloanelor de sol trebuie să fie suficientă pentru a permite detectarea a cel puțin 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment. Pentru substanțele chimice active din produsele de protecție a plantelor, aceasta poate fi bazată pe rata de utilizare maximă recomandată (o singură rată de aplicare) și, atât pentru percolarea substanței parentale, cât și a celei învechite, trebuie să fie raportată la aria suprafeței coloanei de sol utilizate <sup>(1)</sup>.

**Substanța chimică de referință**

25. O substanță chimică de referință trebuie să fie utilizată în experimente de percolare (a se vedea punctul 12). Ea trebuie să fie aplicată pe suprafața coloanei de sol într-un mod similar cu cel al substanței chimice testate și la

<sup>(1)</sup> Cantitatea care trebuie aplicată pe coloanele de sol cilindrice poate fi calculată folosind următoarea formulă:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

unde:

M = cantitatea aplicată pentru fiecare coloană [μg]

A = rata de aplicare [kg · ha<sup>-1</sup>]

d = diametrul coloanei de sol [cm]

π = 3,14



## ▼ M6

o rată corespunzătoare care să permită detectarea adecvată fie ca standard intern împreună cu substanța chimică testată pe aceeași coloană de sol, fie singură pe o coloană de sol separată. De preferință, ambele substanțe chimice trebuie să fie aplicate în aceeași coloană, cu excepția cazului când ambele substanțe chimice sunt marcate în mod similar.

## Soluri

### Selectarea solurilor

26. Pentru studiile de percolare cu substanța chimică testată parentală trebuie utilizate 3 – 4 soluri cu pH-uri, conținut de carbon organic și textură diferite (12). Orientări privind selectarea solurilor pentru experimentele de percolare sunt furnizate în tabelul 1 de mai jos. Pentru substanțele chimice testate ionizabile, solurile selectate trebuie să aibă o gamă largă de pH-uri, pentru a evalua mobilitatea substanței chimice în formele sale ionizate și neionizate; cel puțin 3 soluri trebuie să aibă un pH la care substanța chimică testată este în forma sa mobilă.

Tabelul 1

#### Orientări privind selectarea solurilor pentru studiile percolării

| Solul nr. | Valoarea pH-ului | Carbon organic % | Conținut de argilă % | Textură (*)       |
|-----------|------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| 1         | > 7,5            | 3,5 – 5          | 20 – 40              | lut argilos       |
| 2         | 5,5 – 7          | 1,5 – 3          | 15 – 25              | lut mîlos         |
| 3         | 4 – 5,5          | 3 – 4            | 15 – 30              | lut               |
| 4         | < 4 – 6 §        | < 0,5 – 1,5 § ‡  | < 10 – 15 §          | nisip lutos       |
| 5         | < 4,5            | > 10 #           | < 10                 | nisip lutos/nisip |

(\*) Conform sistemelor FAO și USDA (14).

§ Este de preferat ca variabilele respective să prezinte valori în intervalul dat. Dacă, totuși, apar dificultăți în găsirea unui sol corespunzător, se acceptă valori mai mici decât minimumul indicat.

‡ Solurile cu un conținut de carbon organic mai mic de 0,3 % pot perturba corelația dintre conținutul de substanțe organice și adsorbție. Astfel, se recomandă utilizarea de soluri cu un conținut minimum de carbon organic de 0,3 %.

# Solurile cu un conținut de carbon foarte mare (de exemplu > 10 %) nu pot fi acceptate legal, de exemplu, în scopul înregistrării pesticidelor.

27. Alte tipuri de sol pot fi uneori necesare pentru a reprezenta regiunile mai reci, temperate și tropicale. Prin urmare, în cazul în care sunt preferate alte tipuri de sol, ele trebuie să se caracterizeze prin aceeași parametri și trebuie să aibă variații similare ale proprietăților ca cele descrise în orientările privind selectarea solurilor pentru studiile de percolare (a se vedea tabelul 1 de mai sus), chiar dacă ele nu îndeplinesc perfect criteriile respective.
28. Pentru studii de percolare cu „reziduuri învechite” trebuie utilizat un singur tip de sol (12). Acesta trebuie să aibă un conținut de nisip > 70 % și un conținut de carbon organic între 0,5 – 1,5 % (de exemplu, solul nr. 4 din tabelul 1). Poate fi necesară utilizarea mai multor tipuri de soluri dacă datele privind producții de transformare sunt semnificative.
29. Toate solurile trebuie să fie caracterizate cel puțin din punctul de vedere al texturii [ % nisip, % mîl, % argilă în conformitate cu sistemele de clasificare FAO și USDA (14)], al pH-ului, al capacității de schimb de cationi, al conținutului de carbon organic, al densității în vrac (pentru sol perturbat) și al capacității de reținere a apei. Măsurarea biomasei microbiene este

▼ **M6**

necesară numai pentru solul care este utilizat în perioada de învechire/incubare efectuată înainte de experimentul de percolare a substanței învechite. Informații privind proprietățile suplimentare ale solului (de exemplu, clasificarea solului, mineralogia argilei, aria suprafeței specifice) vor fi utile pentru interpretarea rezultatelor acestui studiu. Pentru determinarea caracteristicilor solului se pot utiliza metodele recomandate în referințele (15)(16)(17)(18)(19).

*Colectarea și depozitarea solurilor*

30. Solurile trebuie prelevate din stratul superior (orizont A) de la o adâncime maximă de 20 cm. Resturile de vegetație, macrofauna și pietrele trebuie eliminate. Solurile (cu excepția celor utilizate pentru a învechirea substanței chimice testate) sunt uscate cu aer la temperatura camerei (de preferință între 20 – 25 °C). Dezagregarea se realizează cu o forță minimă, astfel încât structura originală a solului să se modifice cât se poate de puțin. Solurile se cern printr-o sită de  $\leq 2$  mm. Se recomandă omogenizarea atentă, deoarece aceasta crește reproductibilitatea rezultatelor. Înainte de utilizare, solurile pot fi depozitate la temperatura ambiantă și se mențin uscate cu aer (12). Nu există recomandate limite temporale de depozitare, dar solurile depozitate mai mult de 3 ani trebuie analizate din nou înainte de utilizare pentru determinarea conținutului de carbon organic și a pH-ului.
31. Trebuie furnizate informații detaliate privind istoricul locurilor din care se prelevează solul testat. Aceste detalii includ localizarea exactă [exact stabilită cu ajutorul UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) sau a coordonatelor geografice], acoperirea vegetală, tratamentele cu produsele fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale (12). Dacă solul a fost tratat cu substanța testată sau cu substanțe cu structură analogă pe parcursul precedentilor patru ani, aceste soluri nu trebuie să fie utilizate în studii de percolare.

*Condițiile de testare*

32. În cursul perioadei de testare, coloanele de sol percolante trebuie ținute la întuneric la temperatură ambiantă atâta timp cât această temperatură este menținută într-un interval de  $\pm 2$  °C. Temperaturile recomandate sunt între 18 și 25 °C.
33. Ploaia artificială (0,01 M  $\text{CaCl}_2$ ) trebuie aplicată în mod continuu pe suprafața coloanelor de sol cu o rată de 200 mm în 48 de ore<sup>(1)</sup>; această rată este echivalentă cu aplicare a 251 ml într-o coloană cu un diametru interior de 4 cm. Dacă testul impune, pot fi utilizate și alte rate de ploaie artificială și durate mai lungi.

*Efectuarea testului*

*Percolare cu substanță chimică testată parentală*

34. Coloane de percolare cel puțin în duplicat sunt umplute cu sol netratat, uscat cu aer și cernut ( $< 2$  mm) până la o înălțime de aproximativ 30 cm. Pentru a obține o umplere uniformă, solul se adaugă la coloanele în porții mici cu ajutorul unei cupe și este presat cu ajutorul unui plonjon cu vibrație simultană ușoară a coloanei până când partea superioară a coloanei de sol

<sup>(1)</sup> Aceasta simulează o ploaie extrem de voluminoasă. Media precipitațiilor anuale, de exemplu, în Europa Centrală este de ordinul a 800 – 1 000 mm.

▼ **M6**

nu mai coboară. Umplerea uniformă este necesară pentru a obține rezultate reproductibile din coloana de percolare. Pentru detalii privind tehnicile de umplere a coloanei, a se vedea referințele (20)(21) și (22). Pentru a controla reproductibilitatea procedurii de umplere, se determină greutatea totală a solului umplut în coloane<sup>(1)</sup>; greutatea coloanelor duplicate trebuie să fie similare.

35. După umplere, coloanele de sol sunt preumezite cu ploaie artificială (0,01 M CaCl<sub>2</sub>) de jos în sus, pentru a înlocui aerul din porii solului cu apă. Apoi coloanele de sol sunt lăsate să se echilibreze, iar excesul de apă este eliminat prin efectul gravitației. Metodele de saturație a coloanei sunt revizuite în referința (23).
36. Apoi substanța chimică testată și/sau de referință este aplicată pe coloana de sol (a se vedea, de asemenea, punctele 23 – 25). Pentru a obține o distribuție omogenă, soluțiile, suspensiile sau emulsiile substanței chimice testate și/sau de referință trebuie aplicate uniform pe suprafața coloanei de sol. În cazul în care pentru aplicarea unei substanțe chimice testate se recomandă încorporarea în sol, aceasta trebuie să fie amestecată cu o cantitate mică (de exemplu 20 g) de sol și adăugată la suprafața coloanei de sol.
37. Suprafețele coloanelor de sol sunt acoperite cu un disc sinterizat de sticlă, perle de sticlă, filtre din fibră de sticlă sau hârtie de filtru rotundă pentru a distribui ploaia artificială în mod uniform pe toată suprafața și pentru a evita perturbarea suprafeței solului de către picăturile de ploaie. Cu cât este mai mare diametrul coloanei, cu atât este nevoie de mai multă atenție pentru aplicarea ploii artificiale pe coloanele de sol pentru a asigura o distribuție uniformă a ploii artificiale pe suprafața solului. Apoi, ploaia artificială este adăugată la coloana de sol picătură cu picătura cu ajutorul unui piston sau al unei pompe peristaltice sau a unei pâlnii de picurare. De preferință, percolatul trebuie să fie colectat în fracțiuni, iar volumele lor respective sunt înregistrate<sup>(2)</sup>.
38. După percolare și lăsarea coloanelor să dreneze, coloanele de sol sunt secționate într-un număr corespunzător de segmente în funcție de informațiile necesare a fi obținute din studiu, segmentele sunt extrase cu solvenți adecvați sau cu amestecuri de solvenți adecvate și analizate din punctul de vedere al substanței chimice testate și, dacă este cazul, al produșilor de transformare, al radioactivității totale și al substanței chimice de referință. Percolatul sau fracțiunile de percolat sunt analizate direct sau după extracție din punctul de vedere al acelorși produși. Atunci când se utilizează substanțe chimice testate marcate radioactiv, trebuie identificate toate fracțiunile care conțin  $\geq 10\%$  din radioactivitatea aplicată.

*Percolare cu reziduuri învechite*

39. Solul proaspăt (care nu a fost uscat anterior cu aer) este tratat la o rată corespunzătoare ariei suprafeței coloanelor de sol (a se vedea punctul 24) cu substanța chimică testată marcată radioactiv și incubat în condiții aerobe în conformitate cu metoda de testare C.23 (13). Perioada de incubare (învechire) trebuie să fie suficient de lungă pentru a produce cantități semnificative de produși de transformare; este recomandată o perioadă de învechire

<sup>(1)</sup> Exemple de densități brute pentru solurile perturbate sunt după cum urmează: pentru un sol nisipos 1,66 g · ml<sup>-1</sup>  
 pentru un sol lutos 1,17 g · ml<sup>-1</sup>  
 pentru un sol lutos nisipos 1,58 g · ml<sup>-1</sup>  
 pentru un sol mălos 1,11 g · ml<sup>-1</sup>

<sup>(2)</sup> Volumele de percolat tipice variază între 230 – 260 ml corespunzând la aproximativ 92 – 104 % din ploaia artificială totală aplicată (251 ml) atunci când se utilizează coloane de sol cu diametru de 4 cm și lungime de 30 cm.

▼ **M6**

de un timp de înjumătățire a substanței chimice testate <sup>(1)</sup>, dar nu trebuie să depășească 120 zile. Înainte de percolare, solul învechit este analizat în ceea ce privește substanța chimică testată și produșii ei de transformare.

40. Coloanele de percolare sunt umplute până la o înălțime de 28 cm cu același sol (dar uscat cu aer) ca cel utilizat în experimentul de învechire astfel cum este descris la punctului 34, determinându-se și greutatea totală a coloanelor de sol umplute. Ulterior coloanele de sol sunt premezite astfel cum se descrie la punctul 35.
41. Apoi substanța chimică testată și produșii ei de transformare se aplică pe suprafața coloanelor de sol sub formă de reziduuri de sol învechite (a se vedea punctul 39) ca segment de sol de 2 cm. Este de preferat ca înălțimea totală a coloanelor de sol (sol netratat + sol învechit) să nu depășească 30 cm (a se vedea punctul 34).
42. Percolarea se realizează astfel cum se descrie la punctul 37.
43. După percolare, segmentele de sol și percolatele sunt analizate astfel cum se indică la punctul 38 din punctul de vedere al substanței chimice testate, al produșilor ei de transformare și al radioactivității neextrase. Pentru a se determina cantitatea de reziduuri învechite reținută în stratul superior de 2 cm după percolare, acest segment trebuie analizat separat.

**DATE ȘI RAPORTARE****Tratamentul rezultatelor**

44. Cantitățile de substanță chimică testată, de produși de transformare, neextractabili și, dacă este inclusă, de substanță chimică de referință trebui să fie exprimate în % din doza inițială aplicată pentru fiecare segment de sol și fracțiune de percolat. Trebui realizată o prezentare grafică pentru fiecare coloană, raportând procente constatate la adâncimea solului.
45. Atunci când o substanță chimică de referință este inclusă în aceste studii de percolare pe coloană, percolarea unei substanțe chimice să poată fi evaluată pe o scară relativă utilizând factorii de mobilitate relativă (*relative mobility factors* – RMF; pentru definiție, a se vedea apendicele 3) (1)(11) care permite compararea datelor referitoare la percolare a unor diverse substanțe chimice obținute cu diferite tipuri de sol. Exemple de valori RMF pentru o varietate de substanțe chimice fitosanitare sunt oferite în apendicele 3.
46. Estimările  $K_{oc}$  (coeficientul de adsorție normalizată a carbonului organic) și  $K_{om}$  (coeficientul de distribuție normalizată a materiei organice) pot fi obținute și din rezultatele percolării în coloane prin utilizarea distanței de percolare medie sau corelații consacrate între RMF și  $K_{om}$  respectiv  $K_{oc}$  (4) sau prin aplicarea teoriei cromatografiei simple (24). Totuși, metoda din urmă trebuie utilizată cu precauție, mai ales dacă se ia în considerare faptul că procesul de percolare nu implică exclusiv condiții de fluxuri saturate, ci mai degrabă sisteme nesaturate.

<sup>(1)</sup> În sol se pot forma mai mulți produși majori de transformare, ei putând apărea în diferite momente în cursul unui studiu privind transformarea. În astfel de cazuri, ar putea fi necesară realizarea unor studii privind percolarea cu reziduuri învechite cu vârste diferite.

▼ **M6****Interpretarea rezultatelor**

47. Studiile de percolare în coloană descrise în această metodă permit determinarea potențialului de percolare sau de mobilitate în sol al substanței chimice testate (în studiul de percolare a substanței parentale) și/sau al produșilor de transformare (în studiul de percolare a reziduurilor învechite). Aceste teste nu estimează din punct de vedere cantitativ comportamentul de percolare în condiții de teren, însă ele pot fi utilizate pentru a compara „percolabilitatea” a unei substanțe chimice cu a altor substanțe chimice al căror comportament de percolare poate fi cunoscut (24). De asemenea, ele nu măsoară cantitativ procentul de substanțe chimice aplicate care ar putea ajunge în apele freatice (11). Cu toate acestea, rezultatele studiilor de percolare pe coloană pot contribui la a decide dacă sunt necesare testări suplimentar în mediul natural sau seminatural pentru substanțele chimice care prezintă un potențial mare de mobilitate în testele de laborator.

**Raportul privind testul**

48. Raportul trebuie să conțină:

*Substanța chimică testată și substanța chimică de referință (atunci când este utilizată):*

- denumirea comună, denumirea chimică (nomenclatura IUPAC și CAS), numărul CAS, structura chimică (indicând poziția marcatorului dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante;
- puritățile (impuritățile) substanței chimice testate;
- puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

*Solurile de testare:*

- detalii privind locul de colectare;
- proprietățile solurilor, precum pH-ul, conținutul de carbon organic și de argilă, textura și densitatea brută (pentru solul perturbat);
- activitatea microbiană a solului (numai pentru solul folosit pentru învechirea substanței chimice testate);
- durata depozitării solului și condițiile de depozitare.

*Condiții de testare:*

- datele la care au fost realizate studiile;
- lungimea și diametrul coloanelor de percolare;
- greutatea totală a solului din coloanele de sol;
- cantitatea de substanță chimică testată și, dacă este cazul, a substanței chimice de referință;
- cantitatea, frecvența și durata aplicării ploii artificiale;
- temperatura de desfășurare a experimentului;
- numărul replici (cel puțin două);
- metodele de analiză a substanței chimice testate, a produșilor de transformare și, dacă este cazul, a substanței chimice de referință din diferite segmente de sol și din percolat;
- metodele de caracterizare și identificare a produșilor de transformare în segmentele de sol și în percolat.

**▼ M6***Rezultatele testului:*

- tabele cu rezultatele exprimate în concentrații și ca % din doza aplicată pentru segmentele de sol și percolat;
- bilanțul masic, dacă este cazul;
- volumele de percolat;
- distanțele de percolare și, dacă este cazul, factorii de mobilitate relativă;
- trasarea grafică a % găsit în segmentele de sol în raport cu adâncimea segmentului de sol;
- discutarea și interpretarea rezultatelor.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Annex I to Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, OJ L 172, 22.7.1995, p. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/ Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (13) The following chapters of this Annex:
  - Chapter A.4, vapour pressure
  - Chapter A.6, Water solubility

▼ **M6**

Chapter A.8, Partition coefficient, shake flask method

Chapter A.24, Partition coefficient, HPLC method

Chapter C.7, degradation — abiotic degradation: hydrolysis as a function of pH

Chapter C.18, Adsorption/desorption using a batch equilibrium method

Chapter C.23, Aerobic and anaerobic transformation in soil

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).
- (15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții și unități**

**Reziduu de sol învechit:** Substanța chimică testată și produșii de transformare prezenți în sol după aplicare și după o perioadă suficient de lungă pentru a permite transportul, adsorbția, metabolismul și procesele de disipare pentru a modifica distribuția și natura chimică unei părți din substanța chimică aplicată (1).

**Ploaia artificială:** 0,01 M soluție de  $\text{CaCl}_2$  în apă distilată sau deionizată.

**Distanța medie de percolare:** Partea de jos a secțiunii de sol unde substanța chimică recuperată cumulată = 50 % din totalul substanței chimice recuperate [experiment de percolare normal] sau; (partea de jos a secțiunii de sol unde substanța chimică recuperată cumulată = 50 % din totalul substanței chimice recuperate) – [(grosimea stratului de sol învechit/2)] [studiu de percolare a rezidului învechit]

**Substanța chimică:** o substanță sau un amestec

**Percolat:** Faza apoasă percolată printr-un profil de sol sau o coloană de sol (1).

**Percolare:** Proces prin care o substanță chimică se deplasează descendent prin profilul de sol sau o coloană sol (1).

**Distanța de percolare:** Cel mai adânc segment de sol în care s-a constatat  $\geq 0,5$  % din substanța chimică testată aplicată sau rezidul învechit aplicat după procesul de percolare (echivalentă cu adâncimea de penetrare).

**Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ):** Limita de detecție (LOD) este concentrația unei substanțe chimice sub care identitatea unei substanțe chimice nu mai poate fi deosebită de artefactele analitice. Limita de cuantificare (LOQ) este concentrația unei substanțe chimice sub care concentrația nu poate fi determinată cu o precizie acceptabilă.

**Factorul de mobilitate relativă (Relative Mobility Factor) RMF:** [distanța de percolare a substanței chimice testate (cm)] / [distanța de percolare a substanței chimice de referință (cm)]

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

**Produs de transformare:** toate substanțele chimice rezultate din reacțiile de transformare biotice sau abiotice ale substanței chimice testate, incluzând  $\text{CO}_2$  și produșii legați în reziduuri.

**Sol:** un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceștia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu mase moleculare mari, populat cu organisme mici (în cea mai mare parte microorganisme). Solul poate fi manipulat în două forme:

- neperturbat, așa cum s-a format în timp, în straturile caracteristice ale unei varietăți de tipuri de sol;
- perturbat, așa cum se găsește de obicei în terenurile arabile când eșantioanele se prelevează prin săpare și sunt utilizate în cadrul acestei metode de testare (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

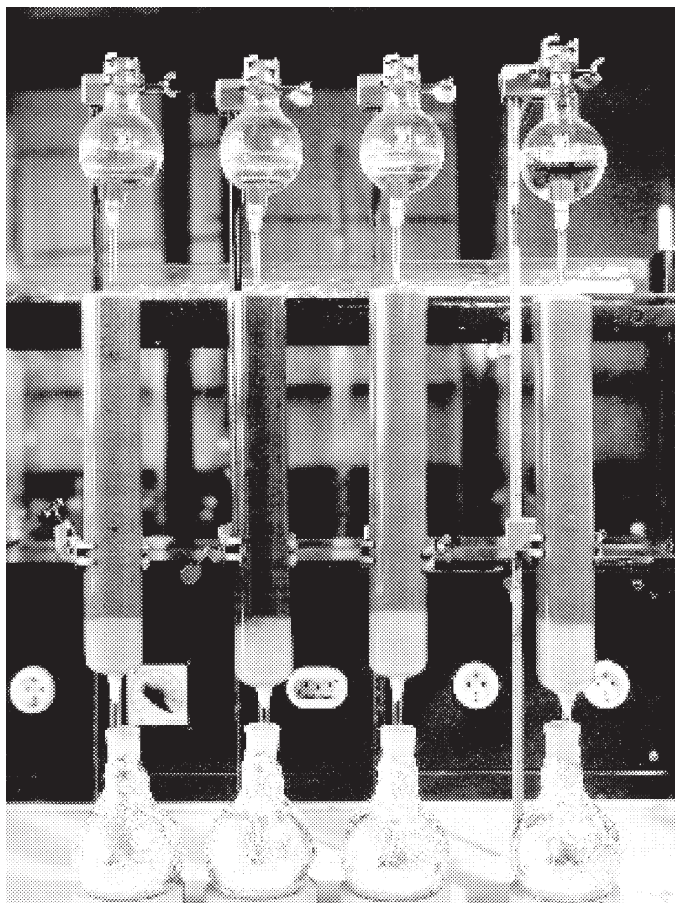


▼ **M6**

## Apendicele 2

Figura 1

**Exemplu de coloane neseccionabile de percolare din sticlă**  
**Cu o lungime de 35 cm și un diametru interior de 5 cm (1)**



← Pâlnie de picurare pentru aplicarea ploii artificiale

← Disc sinterizat din sticlă pentru a evita perturbarea suprafeței solului și pentru a distribui în mod uniform ploaia artificială

← Coloană din sticlă umplută cu sol de testare (atunci când se testează producții fotolabili, coloanele trebuie învelite în folie de aluminiu)

← Strat de nisip de cuarț

← Dop din vată de sticlă pentru a menține solul în coloană

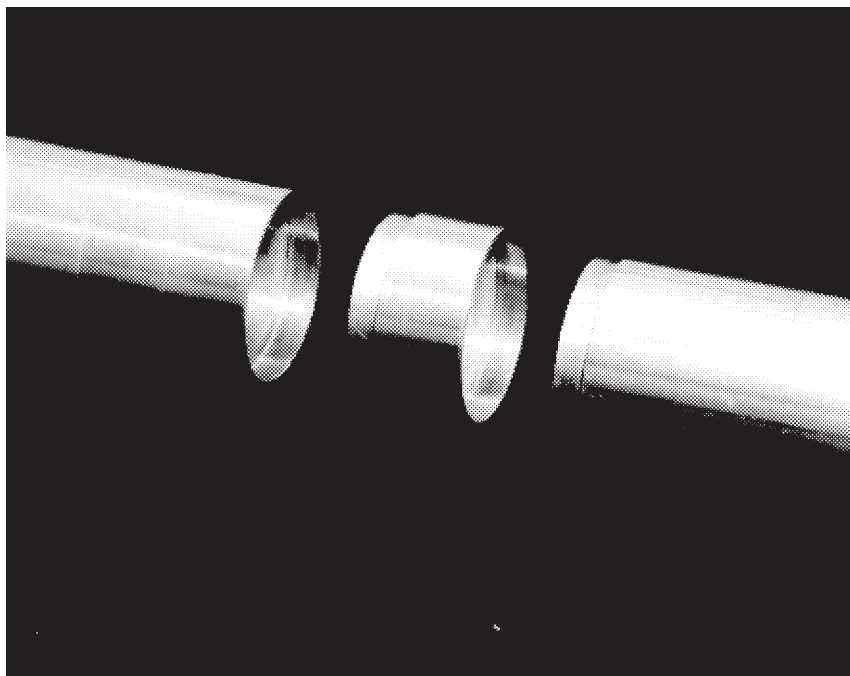
← Flacon cu fund rotund pentru colectarea percolatului; înfășurat în folie de aluminiu pentru a împiedica fotoliza

- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼ **M6**

*Figura 2*

**Exemplu de coloană secționabilă din metal cu un diametru interior de 4 cm (1)**



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼ **M6***Apendicele 3***Exemple de factori de mobilitate relativă (\*) (RMF) pentru o varietate de substanțe chimice fitosanitare (1) (2) și clasele de mobilitate corespunzătoare (+)**

| Interval RMF | Substanța chimică (RMF)   | Clasa de mobilitate    |
|--------------|---|------------------------|
| ≤ 0,15       | Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)  | Îmobilă                |
| 0,15 – 0,8   | Profenofos (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutilazină (0,52), Metidation (0,56), Prometrin (0,59), Propazină (0,64), Alaclor (0,66), Metolaclo (0,68) | II<br>ușor mobilă      |
| 0,8 – 1,3    | Monuron (**), (1), Atrazină (1,03), Simazină (1,04), Flumeturon (1,18)  | III.<br>moderat mobilă |
| 1,3 – 2,5    | Prometon (1,67), Cianazină (1,85), Bromacil (1,91), Carbutilat (1,98)   | IV<br>relativ mobilă   |
| 2,5 – 5      | Carbofuran (3), Dioxacarb (4,33)  | V<br>mobilă            |
| > 5,0        | Monocrotofos (> 5), Dicrotofos (> 5)  | VI<br>foarte mobilă    |

(\*) Factorul de mobilitate relativă este derivat după cum urmează (3):

$$RMF = \frac{\text{distanța de percolare a substanței chimice testate(cm)}}{\text{distanța de percolare a substanței chimice de referință(cm)}}$$

(\*\*) Substanța chimică de referință

+ Alte sisteme de clasificare a mobilității substanței chimice în sol se bazează pe valorile  $R_f$  din cromatografie în strat subțire de sol (4) și pe valorile  $K_{oc}$  (5) (6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.” Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼ **M6****C.45. ESTIMAREA EMISIILOR ÎN MEDIU PROVENITE DE LA LEMNUL TRATAT CU PRODUSE DE CONSERVARE: METODĂ DE LABORATOR PENTRU PRODUSELE DIN LEMN CARE NU SUNT ACOPERITE ȘI CARE SUNT ÎN CONTACT CU APĂ DULCE SAU CU APĂ DE MARE****INTRODUCERE**

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 313 (2007). Emisiile provenite de la lemnul tratat cu produse de conservare în mediu trebuie cuantificate pentru a permite o evaluare a riscurilor pe care lemnul tratat îl prezintă pentru mediu. Această metodă de testare descrie o metodă de laborator pentru estimarea emisiilor provenite lemnul tratat cu produse de conservare în două situații în care emisiile ar putea pătrunde în mediu

— Emisiile provenite de la lemnul tratat în contact cu apa dulce. Emisiile de la suprafața lemnului tratat ar putea pătrunde în apă.

— Emisiile provenite de la lemnul tratat în contact cu apa de mare. Emisiile de la suprafața lemnului tratat ar putea pătrunde în apa de mare.

2. Această metodă de testare vizează testarea emisiilor provenite de la lemn și produsele din lemn care nu sunt acoperite și care se află în contact cu apa dulce sau cu apa de mare. Clasele de utilizare sunt folosite pe plan internațional și clasifică pericolul biologic la care va fi supus produsul tratat. Clasele de utilizare definesc, de asemenea, situația în care se utilizează produsul tratat și determină compartimentele de mediu (aer, apă, sol) care sunt supuse unui risc potențial de către lemnul tratat cu produse de conservare.
3. Metoda de testare este o procedură de laborator destinată obținerii de eșantioane de (emisii) din apa folosită pentru a scufunda lemnul tratat, la intervale de timp tot mai mari după expunere. Cantitatea de emisii din receptorul emisiilor este legată de aria suprafeței lemnului și de durata expunerii, pentru a estima un flux în  $\text{mg/m}^2/\text{zi}$ . Astfel se poate estima fluxul (rata de percolare) după perioade de expunere crescătoare.
4. Cantitatea de emisii poate fi utilizată într-o evaluare a riscurilor ecologice prezentate de lemnul tratat.

**CONSIDERAȚII INIȚIALE**

5. Mecanismul de percolare de la suprafața lemnului de către apa dulce nu se presupune a fi identic din punctul de vedere al naturii și severității cu percolarea de la suprafața lemnului de către apa de mare. Astfel, pentru produsele sau amestecurile de conservare a lemnului utilizate pentru tratarea lemnului, utilizate în mediu cu apă de mare, este necesar un studiu de percolare a lemnului pentru apa de mare.
6. Lemnul, în cazul lemnului tratat cu un produs de conservare, trebuie să fie reprezentativ pentru lemnul utilizat în scopuri comerciale. El trebuie să fie tratat în conformitate cu instrucțiunile producătorului produselor de conservare și în conformitate cu standardele și specificațiile corespunzătoare. Parametrii pentru condiționarea lemnului după tratare trebuie indicați înainte de începerea testului.
7. Eșantioanele de lemn utilizate trebuie să fie reprezentative pentru produsele utilizate (de exemplu, în ceea ce privește specia, densitatea și alte caracteristici).

**▼ M6**

8. Testul poate fi aplicat lemnului cu ajutorul unui proces penetrant sau al unei aplicări superficiale sau lemnului tratat suspus unui tratament de suprafață suplimentar obligatoriu (de exemplu, vopseaua aplicată ca cerință pentru uzul comercial).
9. Compoziția, volumul, pH-ul și forma fizică a apei sunt importante în determinarea cantității, a conținutului și a naturii emisiilor provenite de la lemn.

**PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE**

10. Eșantioanele de lemn de testare tratat cu produse de conservare sunt scufundate în apă. Apa (receptorul emisiilor) este colectată și analizată chimic de mai multe ori pe parcursul perioadei de expunere, suficientă pentru a efectua calcule statistice. Ratele de emisie în  $\text{mg/m}^2/\text{zi}$  sunt calculate pe baza rezultatelor analitice. Perioadele de eșantionare trebuie înregistrate. Testele cu eșantioane netratate pot fi oprite dacă nu există nicio valoare de fond detectată în primele trei puncte de date.
11. Includerea de eșantioane de lemn netratat permite determinarea nivelurilor de fond pentru receptorul emisiilor provenite de la lemn de tip diferit decât cel pentru care au fost folosite produse de conservare.

**CRITERII DE CALITATE****Acuratețea**

12. Precizia metodei de testare pentru a estima emisiile depinde de cât de reprezentative sunt eșantioanele de testare pentru lemnul tratat comercial, de cât de reprezentativă este apa în raport cu apa reală și de cât de reprezentativ este regimul de expunere pentru condiții naturale.
13. Acuratețea, precizia și repetabilitatea metodei analitice trebuie stabilite înainte de efectuarea testului.

**Reproductibilitatea**

14. Trei eșantioane de apă sunt colectate și analizate, iar valoarea medie este considerată ca fiind valoarea emisiilor. Reproductibilitatea rezultatelor în cadrul unui laborator și între diferite laboratoare depinde de regimul de imersiune și de lemnul utilizat ca eșantion de testare.

**Interval acceptabil al rezultatelor**

15. Este acceptabil un interval de rezultate obținute în urma acestui test, în cazul căruia valorile superioară și inferioară variază cu mai puțin de un ordin de mărime.

**CONDIȚII DE TESTARE****Apă**

16. Scenarii de percolare în apă dulce: Pentru evaluarea lemnului expus la apă dulce, pentru testul de percolare se recomandă utilizarea de apă deionizată (de exemplu, ASTM D 1193 de tip II). Temperatura apei trebuie să fie de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , iar pH-ul și temperatura apei măsurate trebuie să fie incluse în raportul privind testul. Analiza eșantioanelor de apă utilizate, prelevate înainte de imersiunea eșantioanelor tratate, permite estimarea substanțelor chimice analizate în apă. Acesta are rol de control menit să determine nivelurile de fond ale substanțelor chimice care sunt apoi analizate chimic.

▼ **M6**

17. Scenarii de percolare în apă de mare: Pentru evaluarea lemnului expus la apa de mare, pentru testul de percolare se recomandă utilizarea apei de mare sintetice (de exemplu, ASTM D 1141 substituent de apă de ocean, fără metale grele). Temperatura apei trebuie să fie de 20 °C +/- 2 °C, iar pH-ul și temperatura apei măsurate trebuie să fie incluse în raportul privind testul. Analiza eșantioanelor de apă utilizate, prelevate înainte de imersia eșantioanelor tratate, permite estimarea substanțelor chimice analizate în apă. Acesta are rol de control pentru analiza nivelurilor de fond pentru substanțele chimice importante.

**Eșantioane de lemn pentru testare**

18. Speciile de lemn trebuie să fie dintre cele utilizate pentru testarea eficacității produselor de conservare a lemnului. Speciile recomandate sunt *Pinus sylvestris* L. (pinul scoțian), *Pinus resinosa* Ait. (pinul roșu) sau *Pinus spp* (pinul sudic). Pot fi efectuate teste suplimentare folosind alte specii.
19. Trebuie să se utilizeze lemn neted, fără noduri. Trebuie evitate exemplarele cu aspect rășinos. Lemnul trebuie să fie reprezentativ pentru lemnul disponibil în comerț. Sursă, densitatea și numărul de inele anuale per 10 mm trebuie înregistrate.
20. Se recomandă ca eșantioanele de lemn de testare să fie constituite din seturi de cinci conforme standardului EN 113 privind dimensiunea blocurilor (dimensiuni de 25 mm × 50 mm × 15 mm), cu fețele longitudinale paralele cu fibra lemnului, deși pot fi utilizate și alte dimensiuni precum 50 mm × 150 mm × 10 mm. Eșantionul de testare trebuie să fie complet scufundat în apă. Eșantioanele de testare se compun 100 % din lemn curățat. Fiecare eșantion este marcat unic astfel încât să poată fi identificat pe toată durata testului.
21. Toate eșantioanele de testare trebuie să fie rindeluite sau tăiate neted, dar suprafețele nu trebuie să fie șmirgheluite.
22. Numărul de seturi de eșantioane de lemn utilizate pentru analizare este de cel puțin cinci: trei seturi de eșantioane sunt tratate cu produs de conservare, un set de eșantioane este netratat, iar un set de eșantioane este utilizat pentru estimarea conținutului de umiditate prin metoda uscării în cuptor a eșantioanelor testate înainte de tratament. Se prepară suficiente eșantioane de testare pentru a permite alegerea a trei seturi de eșantioane care se situează în limita a 5 % din valoarea medie a reținerilor de produs de conservare pentru grupul de eșantioane de testare.
23. Toate eșantioanele sunt izolate la capete cu o substanță chimică care împiedică pătrunderea produsului de conservare în capătul lor sau împiedică percolarea din eșantioane prin intermediul capătului. Este necesar să se facă o distincție între eșantioanele folosite pentru aplicare superficială și procesele de penetrare pentru aplicarea izolanților la capete. Aplicarea izolanților la capete trebuie realizată înainte de tratament numai în cazul aplicării superficiale.
24. Capătul trebuie să fie deschis pentru tratamente prin procese de penetrare. Prin urmare, eșantioanele trebuie să fie izolate la capete la sfârșitul perioadei de condiționare. Emisia trebuie să fie estimată numai pentru suprafața longitudinală. Materialele de izolare trebuie inspectate și reaplicate dacă este necesar înainte de a începe percolarea și nu trebuie reaplicate după ce percolarea a fost inițiată.

**▼ M6****Recipientul de imersie**

25. Recipientul este confecționat dintr-un material inert și este destul de mare pentru a conține 5 eșantioane de lemn EN113 în 500 ml de apă rezultând un raport arie per volum de apă de 0,4 cm<sup>2</sup>/ml.

**Ansamblul de testare a eșantioanelor**

26. Eșantioanele de testare sunt susținute pe un ansamblu care permite ca toate suprafețele expuse ale eșantioanelor să fie în contact cu apa.

**PROCEDURA DE TRATARE CU PRODUS DE CONSERVARE****Pregătirea eșantioanelor de testare tratate**

27. Eșantionul de lemn de testare care urmează să fie tratat cu produsul de conservare supus testării este tratat prin metoda specificată pentru respectivul produs de conservare, care poate fi de un proces de tratare prin penetrare sau un proces de aplicare superficială, de exemplu prin imersie, pulverizare sau pensulare.

*Produsele de conservare aplicate prin procese de tratament prin penetrare*

28. Trebuie preparată o soluție a produsului de conservare care să permită absorbția sau retenția specificată atunci când este aplicată prin intermediul procesului de tratare prin penetrare. Eșantionul de lemn de testare este cântărit, iar dimensiunile sale sunt măsurate. Procesul de tratare prin penetrare trebuie să fie cel specificat pentru aplicarea produsului de conservare a lemnului utilizat în clasa 4 sau 5 de utilizare. Eșantionul este din nou cântărit după tratament și retenția produsului de conservare (kg/m<sup>3</sup>) este calculată pe baza ecuației:

$$\frac{\text{masa după tratament(kg)} - \text{masa înainte de tratament(kg)}}{\text{Volumul eșantionului de testare(m}^3\text{)}} \times \frac{\text{concentrația soluției(\% masă/masă)}}{100}$$

29. Trebuie remarcat faptul că în acest test poate fi utilizat lemn tratat într-o fabrică de tratare industrială (de exemplu, prin impregnare la presiune mică). Procedurile utilizate trebuie înregistrate și retenția materialului tratat astfel trebuie analizată și înregistrată.

*Produsele de conservare care urmează să fie aplicate prin procese de aplicare superficială*

30. Procesul de aplicare superficială include imersia, pulverizarea sau pensularea eșantioanelor de lemn de testare. Procesul și rata de aplicare (de exemplu, litri/m<sup>2</sup>) trebuie să fie astfel cum se specifică pentru aplicarea superficială a produsului de conservare.

31. De asemenea, trebuie remarcat faptul că, în acest caz, lemnul tratat într-o fabrică de tratare industrială pot fi utilizat în acest test. Procedurile utilizate trebuie înregistrate și retenția materialului tratat astfel trebuie analizată și înregistrată.

**Condiționarea eșantioanelor de testare după tratare**

32. După tratare, speciemenle de testare tratate trebuie să fie condiționate în conformitate cu recomandările furnizorului de produse de conservare potrivit cerințelor privind etichetele produselor de conservare sau în conformitate cu practicile de tratare comerciale sau în conformitate cu standardul EN 252.

**▼ M6****Pregătirea și selectarea eșantioanelor de testare**

33. După condiționarea în urma tratării, retenția medie a grupului de eșantioane de testare este calculată, iar trei seturi de eșantioane cu o retenție care se situează în intervalul +/- 5 % din media grupului sunt selectate în mod aleatoriu pentru măsurători ale percolării.

**PROCEDURA PENTRU MĂSURAREA EMISIILOR DE PRODUSE DE CONSERVARE****Metoda prin imersie**

34. Eșantioanele de testare sunt cântărite și apoi scufundate total în apă, înregistrându-se data și ora aferente. Recipientul este acoperit pentru a reduce evaporarea.
35. Apa este înlocuită la următoarele intervale: 6 ore, 1 zi, 2 zile, 4 zile, 8 zile, 15 zile, 22 de zile, 29 de zile (notă: acestea sunt durate totale, nu intervalele de timp). Ora și data schimbării apei și masa de apă recuperată din recipient trebuie înregistrate.
36. După fiecare schimbare a apei, este reținut pentru analize chimice ulterioare un eșantion de apă în care a fost scufundat setul de eșantioane de testare.
37. Procedura de eșantionare permite calcularea profilului cantității de emisii în funcție de timp. Eșantioanele trebuie depozitate în condiții care să asigure conservarea substanței analizate, de exemplu într-un frigider la întuneric pentru a reduce proliferarea microbilor în eșantion înainte de analiză.

**MĂSURAREA EMISIILOR****Eșantioane tratate**

38. Apa colectată este analizată chimic pentru a se verifica substanța activă și/sau produsele de degradare/transformare relevante, dacă este cazul.

**Eșantioane netratate**

39. Colectarea apei (receptorul emisiilor) în acest sistem și analiza ulterioară a substanțelor chimice care au percolat din eșantioanele de lemn netratat permit estimarea posibilei rate de emisii a produsului de conservare din lemnul netratat. Colectarea și analizarea de receptor de emisii după perioade de expunere crescătoare permit estimarea ratei schimbării ratei de emisii în funcție de timp. Această analiză este o procedură de control care vizează determinarea nivelurilor de fond ale substanței chimice testate în lemnul netratat pentru a confirma faptul că lemnul utilizat ca sursă de eșantioane nu a fost tratat anterior cu produse de conservare.

**DATE ȘI RAPORTARE****Analizele chimice**

40. Apa colectată este analizată chimic, iar rezultatul analizei apei este exprimat în unități corespunzătoare, de exemplu  $\mu\text{g/l}$ .

**Înregistrarea datelor**

41. Toate rezultatele sunt înregistrate. Apendicele prezintă un exemplu al formei de înregistrare recomandate pentru un set de eșantioane de testare tratate și tabelul de sinteză pentru calcularea valorilor medii ale emisiilor pentru fiecare interval de eșantionare.
42. Fluxul zilnic al emisiilor exprimat în  $\text{mg/m}^2/\text{zi}$  se calculează împărțirea mediei celor trei măsurători ale celor trei replici la numărul de zile de imersie.



**▼ M6****Raportul privind testul**

43. Cel puțin următoarele informații trebuie furnizate în raportul privind testul.

- Numele furnizorului produsului de conservare supus testării;
- Denumirea sau codul unic sau specific al produsului de conservare supus testării;
- Denumirea comercială sau comună a ingredientului sau a ingredientilor activi cu o descriere generică a excipienților (de exemplu, cosolvenți, rășină) și compoziția în % de m/m a ingredientilor;
- Retenția sau încărcarea relevantă (în kg/m<sup>3</sup> sau, respectiv, l/m<sup>2</sup>) specificată pentru lemnul utilizat în contactul cu apa;
- Speciile de lemn utilizate cu densitatea lor și rata de creștere în inele per 10 mm;
- Încărcarea sau retenția produsului de conservare testat și formula utilizată pentru calcularea retenției exprimată ca l/m<sup>2</sup> sau ca kg/m<sup>3</sup>;
- Metoda de aplicare a produsului de conservare, specificând calendarul de tratament utilizat pentru procesul prin penetrare și metoda de aplicare în cazul folosirii unui tratament superficial;
- Data aplicării produsului de conservare și o estimare a conținutului de umiditate a eșantioanelor de testare, exprimate în procente;
- Procedurile de condiționare utilizate, specificând tipul, condițiile și durata;
- Specificațiile materialului de izolare a capetelor și numărul de aplicări;
- Specificarea oricărui tratament ulterior al lemnului, de exemplu specificarea furnizorului, tipul, caracteristicile și încărcarea unei vopsele;
- Ora și data fiecărui eveniment de imersie, cantitatea de apă utilizată pentru imersia eșantioanelor de testare în cadrul fiecărui eveniment și cantitatea de apă absorbită de lemn pe durata imersiei;
- Orice abatere de la metoda descrisă și orice factori care ar fi putut influența rezultatele.

**BIBLIOGRAFIE**

- (1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
- (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼ **M6***Apendicele 1***Formular de înregistrare pentru metoda de testare**

**Estimarea emisiilor din lemnul tratat cu conservant în mediu: Metodă de laborator pentru produsele din lemn care nu sunt acoperite și care sunt în contact cu apă dulce sau cu apă de mare**

|  |   |
|--|---|
| <b>Locul testării</b>                                      |   |
| <b>Conservant pentru lemn</b>                              |   |
| Furnizorul conservantului                                  |   |
| Denumirea sau codul specific și unic al conservantului     |   |
| Denumirea comercială sau comună a conservantului           |   |
| Excipienți   |   |
| Retenția relevantă pentru lemnul folosit în contact cu apă |   |
| <b>Aplicarea</b>   |   |
| Metoda de aplicare   |   |
| Data aplicării   |   |
| Formula utilizată pentru calcularea retenției:             |   |
| Procedura de condiționare                                  |   |
| Durata condiționării                                       |   |
| Materialul de izolare a capetelor/numărul de aplicări      |   |
| Tratamentul ulterior                                       | dacă este cazul                         |
| <b>Specimene de testare</b>                                |   |
| Specii de lemn   |   |
| Densitatea lemnului  | (minimum ... valoare medie ... maximum) |
| Rata de creștere (inele per 10 mm)                         | (minimum ... valoare medie ... maximum) |
| Conținutul de apă  |   |

**▼ M6**

| <b>Ansamblul de testare (*)</b>                 | <b>Retenție (kg/m<sup>3</sup>)</b>                                    |
|---|---|
| Tratat „x”                                      | Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene |
| Tratat „y”                                      | Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene |
| Tratat „z”                                      | Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene |
| Netratat  |   |
| <b>Variația parametrilor metodei de testare</b> | de exemplu, calitatea apei, dimensiunea specimenelor de testare etc.  |
| (*) x, y, z reprezintă trei eșantioane replică  |   |

▼ **M6**

| Timp    | Schimbarea<br>apei | Masa specimenului |          | Consumul de apă |          | Eșantionul de apă |                |    |    |    |
|---------|--------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|-------------------|----------------|----|----|----|
|         |                    | Tratat (medie)    | Netratat | Tratat (medie)  | Netratat |                   | Apa de testare | x  | y  | z  |
|         | Data               | g                 | g        | g               | g        | nr.               | pH             | pH | pH | pH |
| start   |                    |                   |          |                 |          |                   |                |    |    |    |
| 6 h     |                    |                   |          |                 |          | 1                 |                |    |    |    |
| 24 h    |                    |                   |          |                 |          | 2                 |                |    |    |    |
| 2 zile  |                    |                   |          |                 |          | 3                 |                |    |    |    |
| 4 zile  |                    |                   |          |                 |          | 4                 |                |    |    |    |
| 8 zile  |                    |                   |          |                 |          | 5                 |                |    |    |    |
| 15 zile |                    |                   |          |                 |          | 6                 |                |    |    |    |
| 22 zile |                    |                   |          |                 |          | 7                 |                |    |    |    |
| 29 zile |                    |                   |          |                 |          | 8                 |                |    |    |    |

▼ **M6**

A se realiza tabele separate pentru fiecare ingredient activ

| Timp    | Schimbarea<br>apei | Rezultate analitice                 |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
|---------|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|------|-------|------|-----------------|-------|-------|-------|----------------|----------|----------|----------|
|         |                    | Specimene netratate                 |                             |                               | Specimene tratate        |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
|         |                    | Concentrația<br>i.a. în apă<br>mg/l | Cantitate<br>emisă<br>mg/m2 | Rata<br>emisiilor<br>mg/m2/zi | Concentrația i.a. în apă |      |       |      | Cantitate emisă |       |       |       | Rata emisiilor |          |          |          |
|         | x                  |                                     |                             |                               | y                        | z    | Medie | x    | y               | z     | Medie | x     | y              | z        | Medie    |          |
|         | Data               |                                     |                             |                               | mg/l                     | mg/l | mg/l  | mg/l | mg/m2           | mg/m2 | mg/m2 | mg/m2 | mg/m2/zi       | mg/m2/zi | mg/m2/zi | mg/m2/zi |
| 6 h     |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 24 h    |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 2 zile  |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 4 zile  |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 8 zile  |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 15 zile |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 22 zile |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |
| 29 zile |                    |                                     |                             |                               |                          |      |       |      |                 |       |       |       |                |          |          |          |

*Notă:* Deoarece rezultatele lemnului netratat pot fi utilizate pentru a corecta ratele emisiilor eșantioanelor tratate, ele trebuie să apară primele și toate valorile pentru eșantioanele tratate ar fi „valori corecte”. Poate exista, de asemenea, o corecție pentru analiza inițială a apei.

**▼ M6***Apendicele 2***Definiții**

**Substanța chimică:** o substanță sau un amestec.

**Substanța chimică testată:** orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

▼ **M6**

C.46.

**BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE BENTICE CARE TRĂIESC ÎN SEDIMENTE**

## INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 315 (2008). Animalele endobentice care ingeră sedimente pot fi expuse la substanțe legate de sedimente (1). Printre aceste organisme care ingeră sedimente, oligochetele acvatice joacă un rol important la baza sistemelor acvatice. Acestea trăiesc în sedimente și deseori reprezintă cele mai abundente specii, mai ales în habitate cu condiții de mediu adverse pentru alte animale. Prin forarea sedimentului și prin funcția lor de pradă, aceste animale pot avea o puternică influență asupra biodisponibilității respectivelor substanțe pentru alte organisme, de exemplu peștii care se hrănesc cu organisme bentice. Spre deosebire de organismele epibentice, oligochetele acvatice endobentice sapă galerii în sediment și ingeră particule de sediment de sub suprafața sedimentului. Din acest motiv, aceste organisme sunt expuse la substanțe prin multe căi de absorbție incluzând contactul direct, ingestia de particule de sediment contaminate, apa interstițială sau apa acoperitoare. Unele specii de oligochete bentice care sunt folosite în prezent în cadrul testelor ecotoxicologice sunt descrise în apendicele 6.
2. Parametrii care caracterizează bioacumularea unei substanțe includ, în primul rând, factorul de bioacumulare (*bioaccumulation factor* – BAF), constanta vitezei de absorbție din sediment ( $k_s$ ) și constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ). Definițiile detaliate ale acestor parametri sunt prezentate în apendicele 1.
3. Pentru a evalua potențialul de bioacumulare al substanțelor în general și pentru a investiga bioacumularea substanțelor care tind să pătrundă în sau pe sedimente este necesară o metodă specifică pentru fiecare compartiment (1) (2) (3) (4).
4. Această metodă de testare este concepută pentru a evalua bioacumularea substanțelor asociate sedimentelor la viermii de oligochete endobentice. Substanța testată este adăugată în sediment. Utilizarea sedimentului adăugat are menirea să simuleze un sediment contaminat.
5. Această metodă se bazează pe metodele existente de testare a toxicității și a bioacumulării în sedimente (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Alte documente utile sunt: discuțiile și rezultatele unui atelier de lucru internațional (11) și rezultatul unui test interlaboratoare internațional (12).
6. Acest test se aplică substanțelor organice stabile și neutre care tind să se asocieze cu sedimentele. Bioacumularea compușilor metalo-organici stabili asociați cu sedimentele poate fi, de asemenea, măsurată cu ajutorul acestei metode (12). Acesta nu este aplicabilă în cazul metalelor sau al altor microelemente (11) fără modificarea protocolului de testare în ceea ce privește volumul substratului și al apei și eventual a dimensiunii eșantionului de test.

## CONDIȚII PREALABILE ȘI INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

7. Există disponibile în prezent doar câteva relații structură-activitate cantitative (*Quantitative Structure-Activity Relationships* – QSAR) bine stabilite privind procesele de bioacumulare (14). Cea mai mult folosită relație este corelația între bioacumulare și bioconcentrarea substanțelor organice stabile și lipofilia lor [exprimată ca logaritmul coeficientului de partiție octanol-apă ( $\log K_{ow}$ ); a se vedea apendicele 1 pentru definiție], respectiv, care a fost elaborată pentru descrierea migrării unei substanțe între apă și de pești. Corelații pentru compartimentul de sedimente au fost, de asemenea, stabilite cu

▼ **M6**

ajutorul acestei relații (15), (16), (17), (18). Corelația  $\log K_{ow}$ - $\log BCF$  ca QSAR majoră poate fi utilă pentru o primă estimare preliminară a potențialului de bioacumulare a substanțelor asociate sedimentului. Cu toate acestea, BAF poate fi influențat de conținutul de lipide al organismului testat și de conținutul de carbon organic din sediment. Prin urmare, coeficientul de partiție carbon organic-apă ( $K_{oc}$ ) poate fi, de asemenea, utilizat ca un determinant major al bioacumulării substanțelor organice asociate sedimentului.

8. Acest test se aplică pentru:

- substanțele organice stabile cu valori ale  $\log K_{ow}$  cuprinse între 3 și 6 (5)(19) și substanțele superlipofile care au un  $\log K_{ow}$  mai mare de 6 (5);
- substanțele care aparțin unei clase de substanțe organice cunoscute pentru potențialul lor de bioacumulare în organisme vii, de exemplu agenții tensioactivi sau substanțele ușor absorbabile (de exemplu, cu  $K_{oc}$  mare).

9. Înainte de începerea studiului trebuie obținute informații cu privire la substanța testată, precum precauțiile de siguranță, condițiile adecvate de depozitare și stabilitatea, precum și metodele analitice. Orientări privind substanțele testate cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în (20) și (21). Înainte de efectuarea unui test privind bioacumularea cu oligochete acvatice, sunt necesare următoarele informații privind substanța testată:

- denumirea comună, denumirea chimică (de preferință denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea;
- solubilitatea în apă [metoda de testare A.6 (22)];
- coeficientul de partiție octanol-apă,  $K_{ow}$  [metodele de testare A.8, A.24 (22)];
- coeficientul de partiție sediment-apă, exprimat ca  $K_d$  sau  $K_{oc}$  [metoda de testare C.19 (22)];
- hidroliza [metoda de testare C.7 (22)];
- fototransformarea în apă (23);
- presiunea vaporilor [metoda de testare A.4 (22)];
- biodegradabilitatea rapidă [metodele de testare C.4 și C.29 (22)];
- tensiunea suprafeței [metoda de testare A.5 (22)];
- concentrația critică a micelilor (24).

În plus, următoarele informații – dacă sunt disponibile – ar fi relevante:

- biodegradarea în mediul acvatic [metodele de testare C.24 și C.25 (22)];
- constanta legii lui Henry.

10. Substanțele testate marcate radioactiv pot facilita analiza eșantioanelor de apă, sediment și biologice și pot fi utilizate pentru a determina dacă sunt necesare identificarea și cuantificarea produșilor de degradare. Metoda descrisă aici fost validată printr-un testul interlaboratoare internațional (12) pentru substanțe marcate cu  $^{14}C$ . Dacă reziduurile radioactive totale sunt măsurate, factorul de bioacumulare (BAF) se bazează pe substanța parentală inclusiv orice produs de degradare reținut. De asemenea, este



▼ **M6**

posibilă combinarea unui studiu de metabolism cu un studiu de bioacumulare prin analiza și cuantificarea procentului de substanță parentală și a produșilor ei de degradare în eșantioanele prelevate la sfârșitul fazei de absorbție sau la vârful bioacumulării. În orice caz, se recomandă calcularea BAF pe baza concentrației substanței parentale din organism și nu numai pe baza totalului de reziduuri radioactive.

11. În plus față de proprietățile substanței testate, alte informații necesare sunt toxicitatea pentru speciile de oligochete care urmează să fie utilizate în test, precum concentrația letală mediană ( $LC_{50}$ ) pentru timpul necesar fazei de absorbție, pentru a asigura că respectivele concentrații de expunere selectate sunt mult mai mici decât nivelurile toxice. Dacă sunt disponibile, trebuie utilizate în mod preferențial valorile de toxicitate determinate din studiile de lungă durată folosind parametri de studiu subletali ( $EC_{50}$ ). Dacă astfel de date nu sunt disponibile, un test al toxicității acute în condiții identice cu cele ale testului de bioacumulare sau date privind toxicitatea pentru alte specii surrogat pot furniza informații utile.
12. Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică adecvată pentru care se cunosc acuratețea, precizia și sensibilitatea în vederea cuantificării substanței din soluțiile de testare, din sediment și din materialul biologic, împreună cu detalii privind prepararea și depozitarea eșantioanelor, precum și cu fișe tehnice de siguranță. Limitele de detectare analitică ale substanței testate în apă, în sediment și în țesutul viermilor trebuie, de asemenea, să fie cunoscute. În cazul utilizării unei substanțe testate marcate radioactiv, radioactivitatea specifică ( $Bq\ mol^{-1}$ ), poziția atomului marcat radioactiv și procentul radioactivității asociate cu impurități trebuie, de asemenea, să fie cunoscute. Radioactivitatea specifică a substanței testate trebuie să fie cât mai mare posibil pentru a detecta concentrațiile de testare cât mai mici posibil (11).
13. Trebuie să fie puse la dispoziție informații privind caracteristicile sedimentului care urmează să fie utilizat [originea sedimentului sau a constituenților săi, pH-ul și concentrația de amoniac a apei interstițiale (sedimente naturale), conținutul de carbon organic (TOC), distribuția dimensiunii particulelor (procent de nisip, de măr și de argilă) și procentul greutateii uscate] (6).

## PRINCIPIUL TESTULUI

14. Testul constă în două faze; faza de absorbție (expunere) și faza de eliminare (postexpunere). Pe durata fazei de absorbție, viermii sunt expuși la sediment adăugat cu substanța testată, acoperiți cu apă reconstituită și echilibrați în mod corespunzător (11). Grupele de viermi de control sunt ținute în condiții identice fără substanța testată.
15. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sistem sediment-apă fără substanța testată. O fază de eliminare este necesară pentru a obține informații privind viteza cu care substanța testată este excretată de organisme de testare (19) (25). O fază de eliminare este necesară întotdeauna, exceptând cazul în care absorbția substanței testate în timpul fazei de expunere a fost nesemnificativă (de exemplu, nu există diferențe statistice între concentrația substanței testate în viermi testați și în cei de control). În cazul în care o stare de echilibru nu a fost atinsă în timpul fazei de absorbție, determinarea cineticii –  $BAF_K$ , a constantei sau a constantelor vitezei de absorbție și de eliminare – pot fi efectuate utilizând rezultatele fazei de eliminare. Modificarea concentrației substanței testate din/de pe viermi se monitorizează pe parcursul ambelor faze ale testului.
16. Pe durata fazei de absorbție, se efectuează măsurători până când BAF ajunge la un platou sau la o stare de echilibru. Implicit, durata fazei de absorbție trebuie să fie de 28 de zile. Experiența practică a demonstrat că o fază de absorbție de 12 – 14 zile este suficientă pentru ca mai multe substanțe organice stabile și neutre să atingă o stare de echilibru (6) (8) (9).

## ▼ M6

17. Cu toate acestea, dacă starea de echilibru nu este atinsă în termen de 28 de zile, faza de eliminare este începută prin transferarea oligochetelor în vase conținând același mediu fără substanța testată. Faza de eliminare este încheiată fie atunci când este atins nivelul de 10 % al concentrației măsurate în viermi în ziua 28 a fazei de absorbție, fie după o perioadă maximă de 10 zile. Nivelul rezidual din viermi la sfârșitul fazei de eliminare este raportat ca parametru de studiat suplimentar, adică ca reziduuri neeliminate (*non-eliminated residues* – NER). Factorul de bioacumulare ( $BAF_{ss}$ ) se calculează de preferință ca raportul dintre concentrația din viermi ( $C_w$ ) și din sediment ( $C_s$ ) la starea de echilibru aparentă și ca factor de bioacumulare cinetic,  $BAF_K$  ca raportul între constanta vitezei de absorbție din sediment ( $k_s$ ) și constanta vitezei de eliminare ( $k_e$ ) pe baza unei cinetici de ordinul întâi. Dacă în termen de 28 de zile nu este obținută o stare de echilibru,  $BAF_K$  se calculează pe baza constantei (constantelor) vitezei de absorbție și de eliminare. Pentru modul de calculare, a se vedea apendicele 2. În cazul în care cinetica de ordinul întâi nu este aplicabilă, trebuie utilizate modele mai complexe [apendicele 2 și referința (25)].
18. În cazul în care în termen de 28 de zile nu este obținută o stare de echilibru, faza de absorbție poate, în mod opțional, să fie prelungită pentru grupurile de viermi expuși – dacă sunt disponibili – pentru măsurători suplimentare până la atingerea unei stări de echilibru; în paralel, faza de eliminare trebuie totuși să fie începută în ziua 28 a fazei de absorbție.
19. Constanta vitezei de absorbție, constanta vitezei de eliminare (sau constantele, în cazul în care sunt implicate modele mai complexe), factorul de bioacumulare cinetică ( $BAF_K$ ) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri, se calculează plecând de la ecuații model computerizate (a se vedea apendicele 2 pentru modele). Cât de adecvată este utilizarea unui model poate fi determinată din coeficientul de corelație sau coeficientul de determinare (coeficienții apropiați de 1 indică o bună adecvare).
20. Pentru a reduce variabilitatea în rezultatele testelor pentru substanțele organice cu lipofilie mare, factorii de bioacumulare trebuie să fie exprimați în plus în legătură cu conținutul de lipide al organismelor de testare și cu conținutul de carbon organic (TOC) din sediment (factorul de acumulare biotă-sediment sau BSAF în  $\text{kg sediment TOC kg}^{-1}$  de conținut de lipide în viermi). Această metodă se bazează pe experiențe și pe corelațiile teoretice pentru compartimentul acvatic, în cazul în care – pentru unele clase de substanțe chimice – există o relație clară între potențialul unei substanțe de a se bioacumula și lipofilia acesteia, care a fost bine stabilită pentru pești ca model de organisme (14) (25) (27). De asemenea, există o relație între conținutul de lipide al peștilor de testare și bioacumularea observată a acestor substanțe. Pentru organismele bentice au fost identificate corelații similare (15) (16) (17) (18). Dacă este disponibil suficient țesut de vierme, conținutul de lipide al animalelor de testare poate fi determinat pe același material biologic ca cel utilizat pentru determinarea concentrației de substanță chimică testată. Totuși, este practic să se utilizeze animalele de control aclimatizate cel puțin la începutul sau – de preferință – la finalul fazei de absorbție în vederea măsurării conținutului de lipide, care pot fi apoi utilizate pentru a normaliza valorile BAF.

## VALIDITATEA TESTULUI

21. Pentru ca un test să fie valid, trebuie să se aplice următoarele condiții:
  - Mortalitatea cumulată a viermilor (control și tratament) până la sfârșitul testului nu trebuie să depășească 20 % din numărul inițial.
  - În plus, trebuie să se demonstreze că viermii sapă galerii în sediment pentru a permite o expunere maximă. Pentru detalii, a se vedea punctul 28.

**▼ M6****DESCRIEREA METODEI****Speciile folosite pentru testare**

22. Mai multe specii de oligochete acvatice pot fi folosite pentru testare. Speciile cel mai frecvent folosite sunt enumerate în apendicele 6.
23. Testele de toxicitate (96 h, în numai apă) trebuie efectuate la intervale regulate (de exemplu, în fiecare lună), cu o substanță toxică de referință precum clorura de potasiu (KCl) sau sulfatul de cupru ( $\text{CuSO}_4$ ) (1) pentru a demonstra starea de sănătate a animalelor de testare (1) (6). În cazul în care testele de toxicitate de referință nu sunt efectuate la intervale regulate, lotul organismelor care urmează să fie utilizate într-un test de bioacumulare în sediment trebuie verificat cu ajutorul unei substanțe toxice de referință. Măsurarea conținutului de lipide poate furniza, de asemenea, informații utile privind starea animalelor.

*Cultura organismelor de testare*

24. Pentru a avea un număr suficient de viermi pentru efectuarea testelor de bioacumulare, este utilă menținerea viermilor în cultură de laborator permanentă monospecie. Metodele de cultură în laborator pentru speciile de testare selectate sunt sintetizate în apendicele 6. Pentru detalii, a se vedea referințele (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

**Aparatură**

25. A se evita, pentru toate componentele echipamentelor, utilizarea de materiale care pot dizolva și absorbi substanțele testate sau care pot percola alte substanțe și care pot avea un efect advers asupra animalelor de testare. Pot fi folosite camere standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material inert chimic și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare, adică cu numărul de viermi testați. Trebuie evitată utilizarea de tuburi din plastic moale pentru administrarea apei sau a aerului. Politetrafluoretilena, oțelul inoxidabil și/sau sticla trebuie utilizate pentru orice echipament care intră în contact cu mediul de testare. Pentru substanțele cu coeficienți mari de adsorbție, cum ar fi piretroidele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În aceste cazuri, echipamentul se va elimina după utilizare (5). A se evita, pentru substanțele de testare marcate radioactiv și pentru substanțele volatile, detașarea sau scăparea substanțelor testate detașate. Trebuie utilizate captatoare (de exemplu, flacoane din sticlă de spălare a gazelor) care conțin absorbantă adecvată pentru a reține orice reziduuri care se evaporă din camerele de testare (11).

**Apă**

26. Calitatea apei acoperitoare trebuie să permită supraviețuirea speciei de testare, în perioada de aclimatizare și pe parcursul testării, fără apariția unui comportament sau aspect anormal. Apă reconstituită în conformitate cu metoda de testare C.1 (25) este recomandată pentru utilizarea ca apă acoperitoare în teste, precum și în culturile de laborator ale viermilor. S-a demonstrat că mai multe specii de testare pot supraviețui, crește și se pot reproduce în acest tip de apă (8) fiind asigurată o standardizare maximă a condițiilor de testare și de cultură. Apa trebuie să fie caracterizată cel puțin prin pH, conductivitate și duritate. Analiza micropoluantilor din apă înainte de utilizarea acesteia ar putea să furnizeze informații utile (apendicele 4).
27. Pe toată perioada testării, apa trebuie să fie de calitate constantă. pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9. Duritatea totală trebuie să fie între 90 și 400 mg  $\text{CaCO}_3$  per litru la începutul testului (7). Intervalele pentru pH și duritate în apa reconstituită menționată este indicat în metoda

▼ **M6**

de testare C.1 (25). Dacă se estimează o interacțiune între ionii de duritate și substanța testată, atunci trebuie să se utilizeze apă cu o duritate mai mică. Apendicele 4 sintetizează criteriile suplimentare pentru o apă de diluție acceptabilă conform Orientării TG nr. 210 a OCDE (34).

**Sediment**

28. Calitatea sedimentului trebuie să permită supraviețuirea și, de preferință, reproducerea organismelor de testare în perioada de aclimatizare și pe parcursul testării, fără apariția unui comportament sau aspect anormal. Viermii trebuie să sape galerii în sediment. Comportamentul de săpare de galerii poate influența expunerea și, în consecință, BAF. Prin urmare, tendința de evitare a sedimentului sau comportamentul de săpare de galerii al organismelor de testare trebuie înregistrat, dacă turbiditatea apei acoperitoare permite astfel de observații. Viermii (control și tratamente) trebuie să sape galerii în sediment în 24 de ore de la introducerea în vasele de testare. În cazul în care se observă că în mod permanent nu sapă galerii sau evită sedimentul (de exemplu, peste 20 % timp de peste jumătate din faza de absorbție), aceasta indică faptul că fie condițiile de testare nu sunt adecvate, fie organismele de testare nu sunt sănătoase, fie concentrația substanței testate provoacă acest comportament. În acest caz, testul trebuie oprit și repetat în condiții îmbunătățite. Informații suplimentare privind ingestia de sediment pot fi obținute cu ajutorul metodelor descrise în referințele (35) și (36), în care se specifică ingestia sedimentului sau selectarea particulelor în organismele de testare. Dacă este observabilă, cel puțin prezența sau absența granulelor de fecale pe suprafața sedimentului, care indică ingestie de sediment de către viermi, trebuie înregistrate și luate în considerare pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește căile de expunere.
29. Un sediment artificial bazat pe solul artificial descris în metoda de testare C.8 (40) este recomandat pentru a fi utilizat atât în teste, cât și culturile de laborator ale viermilor (apendicele 5), întrucât sedimentele naturale de calitate adecvată pot să nu fie disponibile pe parcursul întregului an. În plus, organismele indigene precum și posibila prezență a micropoluantilor în sedimentele naturale ar putea influența testul. Mai multe specii de testare pot supraviețui, crește și se pot reproduce în sedimentul artificial (8).
30. Sedimentul artificial trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea constituenților, prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de măr și de argilă), prin conținutul de carbon organic (TOC), prin conținutul de apă și prin pH-ul său. Măsurarea potențialului redox este opțională. Cu toate acestea, sedimentele naturale provenite din locuri nepoluate pot servi drept sediment de testare și/sau de cultură (1). Sedimentele naturale trebuie caracterizate cel puțin prin origine (locul prelevării), pH-ul și conținutul de amoniac din apa interstițială, prin conținutul de carbon organic (TOC), prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de măr și de argilă) și prin procentul de apă (6). Se recomandă ca, înainte de adăugarea cu substanță testată, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior, dacă se estimează formarea de amoniac. La finalul acestei perioade de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Analiza micropoluantilor din sediment sau din constituenții săi înainte de utilizare ar putea furniza informații utile.
- Pregătire*
31. Procedurile de manipulare a sedimentelor naturale înainte de utilizarea acestora în laborator sunt descrise în referințele (1), (6) și (44). În apendicele 5 este descrisă prepararea sedimentului artificial.

**▼ M6***Depozitare*

32. Depozitarea sedimentelor naturale în laborator trebuie să fie cât mai scurtă posibil. U.S. EPA (6) recomandă o perioadă de depozitare de maximum 8 săptămâni la  $4 \pm 2$  °C la întuneric. Nu trebuie să existe un spațiu neumplut deasupra sedimentului în recipientele de depozitare. Recomandări pentru depozitarea sedimentului artificial sunt prezentate în apendicele 5.

**Aplicarea substanței testate**

33. Sedimentul este adăugat cu substanță testată. Procedura de adăugare implică acoperirea unui sau mai multor constituenți ai sedimentului cu substanța testată. De exemplu, nisipul de cuarț sau o parte a acestuia (de exemplu, 10 g de nisip de cuarț per vas de testare) poate fi irigat cu o soluție a substanței testate într-un solvent adecvat, care este ulterior evaporat lent până la uscare. Frațiunea acoperită poate fi apoi amestecată cu solul umed. Cantitatea de nisip din amestecul de substanță testată și de nisip trebuie să fie luată în considerare în momentul preparării sedimentului, adică sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip (6).
34. În cazul sedimentului natural, substanța chimică testată poate fi adăugată prin adăugarea unei porții uscate de sediment conform descrierii de mai sus pentru sedimentul artificial sau prin amestecarea substanței testate în sedimentul umed, cu evaporare ulterioară a oricărui agent de solubilizare utilizat. Solvenții adecvați pentru adăugarea sedimentului umed sunt etanolul, metanolul, eterul monometilic de etilen glicol, eterul dimetilic de etilen glicol, dimetilformamida și trietilen glicolul (5) (34). Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței testate în solventul ales trebuie să reprezinte principalele criterii pentru selectarea unui agent de solubilizare adecvat. Orientări suplimentare privind procedurile de adăugare sunt furnizate în *Environment Canada* (1995) (41). Trebuie să se procedeze cu grijă astfel încât substanța testată adăugată la sediment să fie distribuită minuțios și uniform în sediment. Subeșantioanele replici ale sedimentului adăugat trebuie analizate pentru a verifica concentrația substanței testate în sediment și pentru a determina gradul de omogenitate al distribuției substanței testate.
35. După pregătirea sedimentului adăugat cu apă acoperitoare, este de dorit să se lase timp pentru migrarea substanței de testate din sediment în faza apoasă. De preferință, aceasta trebuie să se realizeze în condițiile de temperatură și aerare utilizate în test. Perioada de echilibrare corespunzătoare depinde de sediment și de substanță și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4 – 5 săptămâni) (28)(42). În acest test nu este necesar să se aștepte un echilibru complet, însă se recomandă o perioadă de echilibrare cuprinsă între 48 de ore și 7 zile. În funcție de scopul studiului, de exemplu, atunci când trebuie reproduse condițiile de mediu, sedimentul adăugat poate fi echilibrat sau învechit într-o perioadă mai lungă (11).

**EFFECTUAREA TESTULUI****Testul preliminar**

36. Se poate dovedi utilă realizarea unui experiment preliminar pentru optimizarea condițiilor de testare ale testului definitiv, de exemplu selecția concentrației (concentrațiilor) substanței testate și durata fazelor de absorbție și de eliminare. Comportamentul viermilor, de exemplu evitarea sedimentului, adică viermii ies din sediment, care poate fi cauzat de substanța de testare și/sau de însuși sedimentul, trebuie observat și înregistrat

▼ **M6**

pe parcursul unui test preliminar. Evitarea sedimentului poate fi, de asemenea, utilizată ca parametru subletal într-un test preliminar pentru estimarea concentrației (concentrațiilor) substanțe testate în vederea utilizării într-un test de bioacumulare.

**Condiții de expunere***Durata fazei de absorbție*

37. Organismele testate sunt expuse la substanța testată în timpul fazei de absorbție. Primul eșantion trebuie prelevat la 4 – 24 de ore după începerea fazei de absorbție. Faza de absorbție trebuie să dureze 28 de zile (1) (6) (11), exceptând cazul în care se poate demonstra că echilibrul a fost atins mai devreme. Starea de echilibru apare atunci când: (i) curba factorilor de bioacumulare la fiecare perioadă de eșantionare în raport cu timpul este paralelă cu axa timpului; (ii) trei analize succesive ale BAF realizate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile nu variază mai mult de  $\pm 20\%$  între ele; și (iii) nu există diferențe semnificative între cele trei perioade de eșantionare (pe baza comparațiilor statistice, de exemplu analiza varianței și analiza regresiei). În cazul în care starea de echilibru nu a fost obținută până în ziua 28, faza de absorbție poate fi încheiată prin începerea fazei de eliminare, iar  $BAF_K$  poate fi calculat pe baza constantelor vitezelor de absorbție și de eliminare (a se vedea, de asemenea, punctele 16 și 18).

*Durata fazei de eliminare*

38. Primul eșantion trebuie prelevat la 4 – 24 de ore după începerea fazei de eliminare, deoarece în timpul perioadei inițiale pot să apară schimbări rapide ale rezidului tisular. Terminarea fazei de eliminare se recomandă să fie realizată fie atunci când concentrația substanței testate este mai mică de 10 % din concentrația stării de echilibru, fie după o durată maximă de 10 zile. Nivelul de reziduuri din viermi la sfârșitul fazei de eliminare este raportat ca parametru studiat secundar. Totuși, perioada poate fi determinată de perioada în care concentrația substanței testate din viermi rămâne deasupra limitei de detecție analitice.

**Organismele testate***Numărul viermilor testați*

39. Numărul de viermi per eșantion trebuie să asigure o masă de țesut de vierme astfel încât masa de substanță de testare per eșantion la începutul fazei de absorbție și, respectiv, la sfârșitul fazei de eliminare, să fie semnificativ mai mare decât limita de detecție pentru substanța testată din materialul biologic. În fazele de absorbție și de eliminare menționate, concentrația din animalele testate este, de obicei, relativ mică (6) (8) (18). Întrucât greutatea individuală pentru multe dintre speciile de oligochete acvatice este foarte mică (5 – 10 mg greutate umedă per individ pentru *Lumbriculus variegatus* și *Tubifex tubifex*), viermii dintr-o cameră de testare replică dată pot fi comasați pentru cântărire și analiza substanței chimice testate. Pentru speciile testate cu o greutate individuală mai mare parte (de exemplu, *Branchiura sowerbyi*) pot fi utilizate camerele de testare replică care conțin un individ, însă în astfel de cazuri trebuie să se crească numărul de replici la cinci pentru fiecare punct de prelevare (11). Totuși, trebuie remarcat faptul că *B. sowerbyi* nu a fost inclusă în testul interlaboratoare (12) și, prin urmare, nu este recomandată ca specie preferabilă pentru această metodă.
40. Trebuie folosiți viermi de dimensiuni similare (pentru *L. variegatus* a se vedea apendicele 6). Ei trebuie să provină din aceeași sursă și trebuie să fie animale adulte sau animale mari aparținând aceleiași categorii de vârstă (a se vedea apendicele 6). Greutatea și vârsta unui animal pot avea un efect semnificativ asupra valorilor BAF (de exemplu, datorită conținutului lipidic diferit și/sau a prezenței ouălor); acești parametri trebuie să fie înregistrați cu precizie. Pentru a măsura greutatea umedă și uscată medie, înainte de începerea testului trebuie cântărit un subeșantion de viermi.

▼ **M6**

41. În ceea ce privește *Tubifex tubifex* și *Lumbriculus variegatus*, se estimează că pe parcursul testului va exista reproducere. Lipsa reproducerii în cadrul unui test de bioacumulare trebuie înregistrată și trebuie luată considerare la interpretarea rezultatelor testelor.

*Încărcare*

42. Trebuie să se utilizeze raporturi sediment-vierme și apă-vierme mari pentru a minimiza reducerea concentrației substanței chimice testate în sediment pe durata fazei de absorbție și pentru a evita scăderea concentrației oxigenului dizolvat. Rata de încărcare aleasă trebuie să corespundă, de asemenea, densităților naturale ale populației pentru specia selectată (43). De exemplu, pentru *Tubifex tubifex*, se recomandă o rată de încărcare de 1 – 4 mg de țesut de vierme (greutate umedă) per gram de sediment umed (8) (11). Referințele (1) și (6) recomandă o rată de încărcare  $\leq 1$  g greutate uscată de țesut de vierme per 50 g de carbon organic în sediment pentru *L. variegatus*.
43. Viermii care urmează să fie utilizați în cadrul unui test sunt extrași din cultură prin cernerea sedimentului de cultură. Animalele (adulte sau de mari dimensiuni care nu prezintă semne de fragmentare recentă) sunt transferate în vase din sticlă (de exemplu, plăci Petri) care conțin apă curată. Dacă condițiile de testare diferă de condițiile de cultură, o fază de aclimatizare de 24 de ore trebuie să fie suficientă. Înainte de cântărire, trebuie să fie eliminat excesul de apă de pe viermi. Aceasta se poate realiza prin plasarea cu atenție a viermilor pe șervețele de hârtie preumezite. Nu este recomandat utilizarea de hârtie absorbantă pentru a usca viermii întrucât aceasta poate provoca stres sau deteriorare a viermilor. Brunson et al. (1998) a recomandat utilizarea de viermi neuscați de aproximativ 1,33 ori mai mari decât biomasa vizată. Acestea procent suplimentar de 33 % corespunde diferenței dintre viermii uscați și viermii neuscați (28).
44. La începutul fazei de absorbție (ziua 0 a testului), organismele de testare sunt îndepărtate din camera de aclimatizare și distribuite în mod aleatoriu în vase (de exemplu, plăci Petri) care conțin apă reconstituită prin adăugarea de grupuri de doi viermi în fiecare vas, până când fiecare vas conține zece viermi. Fiecare dintre aceste grupuri de viermi sunt apoi transferate în mod aleatoriu în vase de testare separate, de exemplu folosind un forceps fin din oțel. Vasele de testare sunt ulterior incubate în condițiile de testare.

*Hrănire*

45. Având în vedere conținutul mic de nutrienți din sedimentul artificial, sedimentul trebuie modificat cu o sursă de hrană. Pentru a nu subestima expunerea organismelor de testare, de exemplu prin alimentarea selectivă cu hrană necontaminată, hrana necesară pentru reproducerea și creșterea organismelor de testare trebuie adăugată în sediment înainte sau pe parcursul aplicării substanței testate (a se vedea apendicele 5).

**Raportul sediment-apă**

46. Raportul sediment-apă recomandat este de 1:4 (45). Acest raport este considerat adecvat pentru a menține concentrațiilor de oxigen la niveluri adecvate și pentru a evita acumularea de amoniac în apa acoperitoare. Conținutul de oxigen în apa acoperitoare trebuie menținut la o saturație  $\geq 40$  %. Apa acoperitoare din vasele de testare trebuie aerată ușor (de exemplu 2 – 4 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului astfel încât să se limiteze la minimum perturbarea acestuia.



**▼ M6****Lumina și temperatura**

47. Perioada de expunere la lumină a culturii și în cadrul testului este de 16 ore (1) (6). Intensitatea luminii în zona de testare trebuie menținută la aproximativ 500 – 1 000 lux. Temperatura trebuie să fie  $20 \pm 2$  °C pe parcursul întregului test.

**Concentrațiile testate**

48. O concentrație de testare (cât mai mică posibil) este utilizată pentru determinarea cineticii absorbției, dar poate fi utilizată o a doua concentrație (mai mare) [de exemplu, (46)]. În acest caz, eșantioanele sunt prelevate și analizate la starea de echilibru sau după 28 de zile pentru a confirma BAF măsurat la concentrația mai mică (11). Concentrația mai mare trebuie selectată astfel încât efectele adverse să poată fi excluse (de exemplu, prin alegerea a aproximativ 1 % din cea mai mică concentrație  $EC_x$  cunoscută fără efecte cronice, astfel cum rezultă din studiile de toxicitate cronică relevante). Concentrația de testare mai mică trebuie să fie semnificativ mai mare decât limita de detecție din eșantioanele de sedimente și biologice prin metoda analitică utilizată. În cazul în care concentrația substanței testate la care se observă efecte este aproape de limita de detecție analitică, se recomandă utilizarea unei substanțe testate marcate radioactiv cu o radioactivitate specifică mare.

**Replicile tratate și de control**

49. Numărul minim de replici tratate pentru măsurătorile cinetice trebuie să fie de trei pe punct de prelevare (11) pe durata fazelor de absorbție și de eliminare. Trebuie utilizate replici suplimentare, de exemplu pentru date de eșantionare suplimentare opționale. Pentru faza de eliminare, un număr corespunzător de replici este pregătit cu sedimente neadiționate și apă acoperitoare, astfel încât viermii tratați să poată fi transferați din vasele tratate desemnate în vase netratate la sfârșitul fazei de absorbție. Numărul total de replici tratate trebuie să fie suficient atât pentru faza de absorbție, cât și pentru faza de eliminare.
50. Ca alternativă, viermii desemnați pentru eșantionare pe durata fazei de eliminare pot fi expuși într-un recipient mare conținând sediment adiționat din același lot ca cel utilizat pentru cinetica absorbției. Trebuie să se demonstreze că condițiile de testare (de exemplu, adâncimea sedimentului, raportul sediment-apă, încărcarea, temperatura, calitatea apei) sunt comparabile cu cele ale replicilor desemnate pentru faza de absorbție. La sfârșitul fazei de absorbție, eșantioanele de apă, de sediment și de viermi trebuie prelevate din acest recipient pentru analiză și un număr suficient de viermi mari care nu prezintă semne de fragmentare recentă trebuie îndepărtați cu grijă și transferați în replicile pregătite pentru faza de eliminare (de exemplu, 10 organisme per vas replică).
51. În cazul în care nu este utilizat niciun alt solvent în afară de apă, trebuie asigurate cel puțin 9 replici cu control negativ (cel puțin 3 eșantionate la început, 3 la sfârșitul absorbției și 3 la sfârșitul eliminării) pentru o analiză biologică și de fond. În cazul în care se utilizează vreun agent de solubilizare pentru aplicarea substanței testate, un solvent de control ar trebui să fie utilizat (trebuie eșantionate cel puțin 3 replici la început, 3 la sfârșitul fazei de absorbție și 3 la sfârșitul fazei de eliminare). În acest caz, trebuie asigurate cel puțin 4 replici cu control negativ (fără solvent) pentru eșantionare la sfârșitul fazei de absorbție. Aceste replici pot fi comparate din punct de vedere biologic cu solventul de control pentru a se obține informații privind posibila influență a solventului asupra organismelor de testare. Detalii sunt incluse în apendicele 3.



▼ **M6****Frecvența de măsurare a calității apei**

52. Ca o condiție minimă, următorii parametri privind calitatea apei trebuie măsurați în apa acoperitoare pe parcursul fazei de absorbție și al fazei de eliminare:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Temperatura                   | în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament pentru fiecare dată de eșantionare și în unul dintre vasele de control o dată pe săptămână și la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare; temperatura în mediul înconjurător (aerul ambiental sau baia de apă) sau în unul dintre vasele de testare reprezentative poate fi, de asemenea, înregistrată, de exemplu în intervale continue sau orare; |
| Conținutul de oxigen dizolvat | în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament și în unul dintre vasele de control pentru fiecare dată de eșantionare; exprimat în mg/L și % ASV (valoarea de saturație din aer);   |
| Alimentarea cu aer            | controlată cel puțin o dată pe zi (zile lucrătoare) și ajustată, dacă este necesar;   |
| pH                            | în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament pentru fiecare dată de eșantionare și în unul dintre vasele de control o dată pe săptămână și la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare;   |
| Duritatea totală a apei       | cel puțin în unul dintre vasele de tratament și în unul dintre vasele de testare de control la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție și eliminare, exprimată ca mg/l $\text{CaCO}_3$ ;   |
| Conținutul total de amoniac   | cel puțin în unul dintre vasele de tratament și în unul dintre vasele de testare de control la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare; exprimat ca mg/l $\text{NH}_4^+$ sau $\text{NH}_3$ sau total amoniac-N.  |

**Eșantionarea și analiza viermilor, a sedimentului și a apei***Calendarul eșantionării*

53. Exemple de programe de eșantionare pentru o fază de absorbție de 28 de zile și o fază de eliminare de 10 zile sunt prezentate în apendicele 3.
54. Se prelevează eșantioane de apă și de sediment din camerele de testare pentru determinarea concentrației substanței testate înainte de introducerea viermilor și pe parcursul fazelor de absorbție și de eliminare. Pe durata testării, se determină concentrațiile substanței testate din viermi, sediment și apă cu scopul de a monitoriza distribuția substanței testate în compartimentele sistemului de testare.
55. Se prelevează eșantioane de viermi, de sediment și de apă de cel puțin șase ori pe durata fazei de absorbție și a fazei de eliminare.
56. Se continuă eșantionarea până la stabilirea unui platou (starea de echilibru) (a se vedea apendicele 1) sau timp de 28 de zile. În cazul în care platoul nu a fost atins până în ziua 28, se începe faza de eliminare. La începerea fazei de eliminare, se transferă viermii desemnați în camere replică care conțin sediment și apă netratate (a se vedea, de asemenea, punctele 17 și 18).

*Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor*

57. Se obțin eșantioane de apă prin decantare, sifonare sau pipetarea unui volum suficient pentru măsurarea cantității substanței testate din eșantion.
58. Apa acoperitoare rămasă este decantată sau sifonată cu atenție din camera (camerele de testare). Eșantioanele de sediment trebuie prelevate cu atenție, astfel încât viermii să fie perturbați la minimum.

## ▼ M6

59. Se îndepărtează toți viermii din vasele de testare replică în momentul eşantionării, de exemplu prin suspendarea sedimentului și a apei acoperitoare și răspândirea conținutului fiecărei replici pe o tavă de mică adâncime, culegând viermii cu ajutorul unui forceps fin din oțel. Viermii se clătesc rapid cu apă pe o tavă de mică adâncime din sticlă sau din oțel. Se îndepărtează excesul de apă. Se transferă cu atenție viermii într-un vas precântărit și se cântăresc. Se sacrifică viermii prin înghețare (de exemplu la  $\leq -18$  °C). Prezența și numărul de coconi și/sau de exemplare tinere trebuie înregistrate.
60. În general, viermii trebuie cântăriți și sacrificați imediat după prelevare în absența unei faze de purjare intestinală pentru a obține un BAF conservator care să includă conținut intestinal contaminat, precum și pentru a evita pierderile de reziduuri ale corpului în timpul unei perioade de purjare a intestinelor numai în apă (8). Este de așteptat că substanțele cu  $\log K_{ow}$  mai mare de 5 nu se elimină în mod semnificativ în cursul unei perioade de purjare intestinală numai în apă, în timp ce substanțele cu  $\log K_{ow}$  mai mic de 4 pot fi pierdute în cantități importante (47).
61. În timpul fazei de eliminare, viermii își curăță intestinele în sedimentul curat. Aceasta înseamnă că măsurătorile efectuate imediat înainte de faza de eliminare includ sediment contaminat cu excreții, în timp ce după perioada inițială de 4 – 24 de ore a fazei de eliminare, cea mai mare parte a conținutului contaminat cu excreții se presupune că este înlocuit cu sediment curat (11) (47). Concentrația din viermii din acest eşantion poate fi apoi considerată drept concentrația tisulară după purjare intestinală. Pentru a ține cont de diluția concentrației substanței testate de sedimentul necontaminat în timpul fazei de eliminare, greutatea conținutului intestinal poate fi estimată din raportul greutate umedă vierme/greutate cenușă vierme sau din raportul greutate uscată vierme/greutate cenușă vierme.
62. În cazul în care scopul unui studiu specific este de a măsura biodisponibilitatea și reziduurile tisulare reale din organismele de testare, atunci cel puțin un subeșantion de animale tratate (de exemplu, din trei vase replică suplimentare), de preferință eşantionate pe parcursul stării de echilibru, trebuie cântărite, purjate în apă curată pentru o perioadă de 6 ore (de 47 de) și cântărite din nou înainte de analiză. Datele privind greutatea viermilor și concentrația din corp pentru acest subeșantion pot fi ulterior comparate cu valorile obținute pentru viermi nepurjați. Viermii desemnați pentru măsurarea eliminării nu trebuie purjați înainte de transferul în sedimentul curat pentru a minimiza stresul suplimentar pentru animale.
63. De preferință, eşantioanele de apă, de sediment și de viermi se analizează imediat (adică în termen de 1 – 2 zile) după îndepărtare pentru a preveni degradarea sau alte pierderi și pentru a calcula vitezele aproximative de absorbție și de eliminare pe măsură ce testul avansează. O analiză imediată determină și evitarea întârzierilor în stabilirea momentului în care a fost atins un platou.
64. În cazul în care nu este efectuată o analiză imediată, eşantioanele trebuie depozitate în condiții adecvate. Se obțin informații privind stabilitatea și condițiile de depozitare adecvate pentru substanța testată în cauză înainte de începerea studiului (de exemplu, durata și temperatura de depozitare, procedurile de extragere etc.). Dacă astfel de informații nu sunt disponibile, dar sunt considerate necesare, pot fi utilizate simultan țesuturi de control adiționale pentru a determina stabilitatea la depozitare.

*Calitatea metodei analitice*

65. Întrucât întreaga procedură este determinată, în principal, de acuratețea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța testată, trebuie verificat în mod experimental că precizia și reproductivitatea analizei chimice, precum și recuperarea substanței testate din eşantioanele de apă, de sediment și de viermi sunt pe deplin satisfăcătoare în cazul particular al

▼ **M6**

respectivei metode. De asemenea, trebuie să se verifice că substanța testată nu poate fi detectată în camerele de control la concentrații mai mari decât cele de fond. Dacă este necesar, se corectează valorile  $C_w$ ,  $C_s$  și  $C_a$  pentru valorile de control pentru recuperări și de fond. Pe întreaga durată a testului, toate eșantioanele trebuie manipulate astfel încât să se minimizeze contaminarea și pierderile (rezultate, de exemplu, din absorbția substanței testate pe dispozitivul de eșantionare).

66. Recuperarea totală și recuperarea substanței testate din viermi, din sediment și din apă și, dacă se utilizează, din captatoarele care conțin absorbant pentru a reține substanța testată evaporată, trebuie înregistrate și raportate.
67. Întrucât se recomandă utilizarea de substanțe marcate radioactiv, este posibil să se analizeze radioactivitatea totală (produși parentali și de degradare). Totuși, dacă este fezabilă din punct de vedere analitic, cuantificarea substanței parentale și a produșilor de degradare în starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție poate furniza informații importante. Dacă se intenționează efectuarea unor astfel de măsurători, eșantioanele trebuie apoi supuse unor proceduri adecvate de extragere, astfel încât substanța parentală să poate fi cuantificată separat. Atunci când un produs de degradare detectat reprezintă un procent semnificativ (de exemplu, > 10 %) din radioactivitatea măsurată în organismele de testare în starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție, se recomandă identificarea respectivelor produși de degradare (5).
68. Ca urmare a unei biomase individuale mici, de multe ori nu este posibil să se determine concentrația substanței testate din fiecare vierme individual, cu excepția cazului în care ca specie de testare este folosită specia *Branchiura sowerbyi* (40 – 50 mg greutate umedă per vierme) (11). Prin urmare, comasarea indivizilor eșantionați dintr-un anumit vas de testare este acceptabilă, însă aceasta restrânge procedurile statistice care pot fi aplicate datelor. În cazul în care o procedură statistică specifică și puterea reprezintă considerente importante, atunci trebuie incluse în test un număr adecvat de animale de testare și/sau de camere de testare replică pentru a putea obține agregarea, procedura și puterea dorite.
69. Se recomandă ca BAF să fie exprimat atât în funcție de greutatea umedă totală, de greutatea uscată totală și, dacă este necesar (de exemplu, pentru substanțele foarte lipofile) în funcție de conținutul de lipide și de TOC din sediment. Pentru determinarea conținutului de lipide trebuie utilizate metode adecvate (48) (49). Se poate recomanda tehnica de extragere cu cloroform/metanol (50), ca metodă standard (48). Totuși, pentru a evita utilizarea solvenților clorurați, poate fi utilizată o modificare testată interlaboratoare a metodei Bligh și Dyer (50) astfel cum este descrisă în (51). Întrucât metodele diferite nu oferă rezultate identice (48), este important să se precizeze detaliile metodei utilizate. Ori de câte ori este posibil, adică atunci când este disponibil suficient țesut de vierme, măsurarea conținutului de lipide se realizează pe aceleași eșantioane sau extracte ca cele produse pentru analiza substanței chimice testate, întrucât, adesea, lipidele trebuie îndepărtate din extras înainte de analiză prin cromatografie (5). Totuși, este practic să se utilizeze animale de control acclimatizate cel puțin la începutul sau – de preferință – la sfârșitul fazei de absorbție în vederea măsurării conținutului de lipide, de exemplu în trei eșantioane.

**DATE ȘI RAPORTARE****Tratamentul rezultatelor**

70. Curba de absorbție a substanței testate este obținută prin trasarea la scală aritmetică a concentrației substanței testate în/pe viermi pe parcursul fazei de

**▼ M6**

absorbție în funcție de timp. În cazul în care curba a ajuns la un platou, se calculează  $BAF_{ss}$  pentru starea de echilibru:

$$\frac{C_a \text{ la starea de echilibru sau în ziua 28 (medie)}}{C_s \text{ la starea de echilibru sau în ziua 28 (medie)}}$$

71. Se determină factorul de bioacumulare cinetică (BAFK) ca raport între  $k_s/k_e$ . Constanta de eliminare ( $k_e$ ) se determină de obicei din curba de eliminare (adică o curbă a concentrației substanței testate din viermi pe parcursul fazei de eliminare). Constanta vitezei de absorbție  $k_s$  este apoi calculată din cinetica curbei de absorbție. Metoda preferată pentru obținerea  $BAF_K$  și a constantelor vitezelor  $k_s$  și  $k_e$  este utilizarea metodelor computerizate de estimare a parametrilor neliniari (a se vedea apendicele 2). Dacă este evident că eliminarea nu este de ordinul întâi, atunci trebuie utilizate modele mai complexe (25) (27) (52).
72. Factorul de acumulare biotă-sediment (BSAF) este determinat prin normalizarea BAFK pentru conținutul de lipide din viermi și pentru conținutul total de carbon organic din sediment.

**Interpretarea rezultatelor**

73. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție, atunci când concentrațiile măsurate ale concentrațiilor de testare se află la niveluri apropiate de limita de detecție a metodei de analiză utilizate.
74. Curbele de absorbție și de eliminare clar definite constituie o indicație a bunei calități a datelor referitoare la bioacumulare. În general, limitele de încredere pentru valorile BAF din studii bine concepute nu trebuie să depășească 25 % (5).

**Raportul privind testul**

75. Raportul privind testul trebuie să includă următoarele informații:

*Substanța testată*

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice, de exemplu log  $K_{ow}$ , solubilitatea în apă;
- date de identificare a substanței chimice; sursa substanței chimice testate, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat;
- în cazul marcării radioactive, poziția precisă a atomilor marcați, radioactivitatea specifică și procentul de radioactivitate asociată cu impuritățile.

*Speciile folosite pentru testare*

- denumire științifică, tulpină, sursă, orice pretratament, aclimatizare, vârstă, gama de dimensiuni etc.

*Condițiile de testare*

- procedura de testare utilizată (de exemplu, statică, semistatică sau cu flux continuu);
- tipul și caracteristicile iluminării utilizate și perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- protocolul de testare (de exemplu, numărul, materialul și dimensiunea camerelor de testare, volumul de apă, masa și volumul sedimentului, rata de înlocuire a volumului de apă (pentru procedurile cu flux continuu sau semistatice), orice aerare utilizată înainte și pe parcursul testului, numărul de replici, numărul de viermi per replică, numărul de concentrații de testare, durata fazelor de absorbție și de eliminare, frecvența eșantionării);

**▼ M6**

- metoda de preparare și aplicare a substanței testate, precum și motivele alegerii unei metode specifice;
- concentrațiile de testare nominale;
- sursa constituenților apei și sedimentului artificial sau – în cazul în care se utilizează medii naturale – originea apei și a sedimentului, descrierea oricărui tratament prealabil, rezultatele oricărei demonstrații a capacității animalelor de testare de a trăi și/sau de a se reproduce în mediile utilizate, caracteristicile sedimentului [pH-ul și amoniacul din apa interstițială (sediment natural), conținutul de carbon organic (TOC), distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de măr și de argilă), procentul conținutului de apă, precum și orice alte măsurători efectuate] și caracteristicile apei [pH, duritate, conductivitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual (dacă se măsoară), precum și orice alte măsurători efectuate];
- greutatea uscată nominală și măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) a sedimentului artificial; greutatea uscată măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) pentru sediment natural;
- calitatea apei din camerele de testare caracterizată prin temperatură, pH, amoniac, duritatea totală și concentrația oxigenului dizolvat;
- informații detaliate privind tratamentul eșantioanelor de apă, de sediment și de viermi, inclusiv detalii privind pregătirea, depozitarea, procedurile de adăugare, extragerea și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța testată și conținutul de lipide, precum și recuperările substanței testate.

*Rezultate*

- mortalitatea în rândul viermilor de control și al viermilor din fiecare cameră de testare și orice efecte subletale observate inclusiv orice comportament anormal (de exemplu, evitarea sedimentului, prezența sau absența granulelor de fecale, lipsa reproducerii);
- greutatea uscată măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) a sedimentului și a organismelor de testare (utilă pentru normalizare);
- conținutul de lipide din viermi;
- curbe care indică cinetica de absorbție și de eliminare ale substanței testate în viermi și timpul până la starea de echilibru;
- $C_a$ ,  $C_s$  și  $C_w$  (împreună cu deviația standard și intervalul, dacă este cazul) pentru toate momentele de eșantionare ( $C_a$  exprimată în  $\text{g kg}^{-1}$  greutate umedă și uscată a întregului organism,  $C_s$  exprimată în  $\text{g kg}^{-1}$  greutate umedă și uscată a sedimentului și  $C_w$  exprimată în  $\text{mg l}^{-1}$ ). În cazul în care este necesar un factor de acumulare biotă-sediment (BSAF; a se vedea apendicele 1 pentru definiție) (de exemplu pentru compararea rezultatelor obținute din două sau mai multe teste efectuate cu animale cu conținut diferit de lipide),  $C_a$  trebuie exprimată suplimentar ca  $\text{g kg}^{-1}$  conținut de lipide din organism, iar  $C_s$  trebuie exprimată ca  $\text{g kg}^{-1}$  carbon organic (CO) din sediment;
- BAF (exprimat în  $\text{kg de sediment umed kg}^{-1}$  viermii umezi), constanta vitezei de absorbție din sediment  $k_s$  (exprimată în  $\text{g sediment umed kg}^{-1}$  viermii umezi  $\text{d}^{-1}$ ), precum și constanta vitezei de eliminare  $k_e$  (exprimată în  $\text{d}^{-1}$ ); BSAF (exprimat în  $\text{kg sediment CO kg}^{-1}$  conținut de lipide din viermi) poate fi raportat suplimentar;

**▼ M6**

- Reziduuri neeliminate (NER) la sfârșitul fazei de eliminare;
- dacă sunt măsurate: procente de substanță parentală, de produși de degradare și de reziduuri legate (adică, procentul de substanță testată care nu poate fi extrasă cu metodele de extragere comune) detectate la animalele de testare;
- metodele utilizate pentru analizele statistice ale datelor.

*Evaluarea rezultatelor*

- conformitatea rezultatelor cu criteriile de validitate enumerate la punctul 21;
- rezultate neprevăzute sau neobișnuite, de exemplu eliminarea incompletă a substanței testate din animalele de testare; în astfel de cazuri rezultatele obținute din orice studii preliminare pot furniza informații utile.

▼ **M6***Apendicele 1***Definiții și unități**

**Sedimentul artificial**, sau sedimentul formulat, reconstituit sau sintetic, este un amestec de materiale utilizate pentru simularea componentelor fizice ale unui sediment natural.

**Bioacumularea** este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism în raport cu concentrația acestei substanțe testate în mediul înconjurător. Bioacumularea rezultă atât din procesul de bioconcentrare, cât și din cel de bioamplificare (a se vedea mai jos).

**Factorul de bioacumulare** (*bioaccumulation factor* – BAF) în orice moment pe parcursul fazei de absorbție a acestui test de bioacumulare este concentrația substanței testate în/pe organismul testat ( $C_a$  în  $\text{g kg}^{-1}$  greutate umedă sau uscată) împărțită la concentrația substanței în mediul înconjurător ( $C_s$  ca  $\text{g kg}^{-1}$  greutate umedă sau uscată a sedimentului). Pentru referirea la unitățile  $C_a$  și  $C_s$ , BAF este exprimat în unități de  $\text{kg sediment kg}^{-1}$  vierme (15).

**Factorii de bioacumulare** calculați direct din raportul dintre constanta vitezei de absorbție din sediment împărțită la constantele vitezei de eliminare ( $k_s$  și, respectiv,  $k_e$  – a se vedea mai jos) sunt denumite factor de bioacumulare cinetică (*kinetic bioaccumulation factor* –  $\text{BAF}_K$ ).

**Bioconcentrarea** este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism, care rezultă exclusiv din absorbția prin intermediul suprafeței organismului, în raport cu concentrația acestei substanțe testate din mediul înconjurător.

**Bioamplificarea** este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism, care rezultă în principal din absorbția din alimente sau pradă contaminate, în raport cu concentrația substanței testate în hrană sau în pradă. Bioamplificarea poate duce la un transfer sau la o acumulare a substanței testate în rețelele trofice.

**Factorul de acumulare biotă-sediment** (*biota-sediment accumulation factor* – BSAF) este concentrația stabilizată normalizată pentru lipide a substanței testate în/pe organismul testat împărțită la concentrația normalizată pentru carbon organic a substanței în sediment la starea de echilibru.  $C_a$  este apoi exprimată ca  $\text{g kg}^{-1}$  conținut de lipide al organismului, iar  $C_s$  ca  $\text{kg}^{-1}$  conținut organic al sedimentului.

**Perioada de condiționare** este utilizată pentru stabilizarea componentei microbiene a sedimentului și pentru eliminarea, de exemplu, a amoniacului provenit din componentele sedimentului; ea se derulează înainte de adăugarea sedimentului cu substanța testată. De obicei, apa acoperitoare este eliminată după condiționare.

**Eliminarea** unei substanțe testate înseamnă pierderea de substanță din țesutul organismului de testare prin procese active sau pasive care se produc independent de prezența substanței testate în mediul înconjurător.

**Faza de eliminare** este timpul, după transferul organismelor de testare dintr-un mediu contaminat într-un mediu în care nu se află substanța testată, pe parcursul căruia se studiază eliminarea (sau pierdere netă) substanței din organisme de testare.

**Constanta vitezei de eliminare** ( $k_e$ ) este valoarea numerică care definește viteza de scădere a concentrației substanței testate în/pe organismul de testare, după transferul organismelor de testare dintr-un mediu care conține substanța testată într-un mediu fără substanțe chimice;  $k_e$  este exprimată ca  $\text{d}^{-1}$ .

**▼ M6**

**Perioada de echilibrare** este utilizată pentru a permite distribuirea substanței testate între faza solidă, apa interstițială și apa acoperitoare; ea se derulează după adăugarea sedimentului cu substanța testată și înainte de adăugarea organismelor de testare.

**Coeficientul de partiție octanol-apă ( $K_{ow}$ )** este raportul dintre solubilitatea unei substanțe în n-octanol și în apă la echilibru, exprimată uneori și ca  $P_{ow}$ . Logaritmul lui  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare al unei substanțe în organismele acvatice.

**Coeficientul de partiție carbon organic-apă ( $K_{oc}$ )** este raportul dintre concentrația unei substanțe în/pe fracția de carbon organic a unui sediment și concentrația substanței în apă la echilibru.

**Apa acoperitoare** este apa care acoperă sedimentul în vasul de testare.

**Platoul sau starea de echilibru** înseamnă echilibrul între procesele de absorbție și de eliminare care apare simultan în timpul fazei de expunere. Starea de echilibru este atinsă în graficul BAF pentru fiecare perioadă de eșantionare în funcție de timp atunci când curba devine paralelă cu axa timpului, iar trei analize succesive ale BAF realizate asupra unor eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se mențin într-un interval de 20 % una față de alta și nu există diferențe statistice semnificative între cele trei perioade de eșantionare. Pentru substanțele testate care se absorb lent, intervalele cele mai adecvate ar fi de șapte zile (5).

**Apa interstițială** este apa care ocupă spațiul dintre particulele de sediment sau de sol.

**Constanta vitezei de absorbție din sediment ( $k_s$ )** reprezintă valoarea numerică care definește viteza de creștere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat care rezultă din absorbția din sediment.  $k_s$  se exprimă în  $\text{g sediment kg}^{-1}$  de vierme  $\text{d}^{-1}$ .

**Sedimentul adăugat** este sedimentul în care se adaugă substanța testată.

**Factorul de bioacumulare la starea de echilibru ( $BAF_{ss}$ )** este BAF la starea de echilibru și nu se modifică în mod semnificativ în cursul unui interval lung de timp, concentrația substanței testate în mediul înconjurător ( $C_s$  exprimată ca  $\text{g kg}^{-1}$  greutate uscată sau umedă de sediment) fiind constantă în acest interval de timp.

**Faza de absorbție sau de eliminare** înseamnă timpul în care organismele testate sunt expuse la substanța testată.



▼ **M6***Apendicele 2***Calculul parametrilor de absorbție și de eliminare**

Principalul parametru studiat al unui test de bioacumulare este factorul de bioacumulare, BAF. BAF măsurat poate fi calculat prin împărțirea concentrației substanței testate în organismul de testare,  $C_a$ , la concentrația substanței testate din sediment,  $C_s$ , la starea de echilibru. În cazul în care starea de echilibru nu se atinge în timpul fazei de absorbție, BAF se calculează în același mod pentru ziua 28. Cu toate acestea, ar trebui să se indice dacă BAF se bazează sau nu pe concentrațiile la starea de echilibru.

Mijlocul preferat de obținere a factorului de bioacumulare cinetică ( $BAF_K$ ), a constantei vitezei de absorbție din sediment ( $k_s$ ) și a constantei vitezei de eliminare ( $k_e$ ) este recurgerea la metode computerizate de estimare a parametrilor neliniari. Dată fiind seria de timp a factorilor de acumulare medii ( $C_a$ , valorile medii ale fiecărei date de eșantionare/ $C_s$ , valorile medii ale fiecărei date de eșantionare = AF) a fazei de absorbție în funcție de greutatea umedă a viermelui și a sedimentului, și ecuația model

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{ecuația 1}]$$

unde  $AF(t)$  este raportul dintre concentrația substanței testate în viermi și concentrația acesteia în sediment în orice moment ( $t$ ) pe parcursul fazei de absorbție, aceste programe informatice calculează valorile  $BAF_K$ ,  $k_s$  și  $k_e$ .

Atunci când se atinge starea de echilibru pe parcursul fazei de absorbție (i.e.  $t = \infty$ ), ecuația 1 poate fi redusă la:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{ecuația 2}]$$

unde

$k_s$  = constanta vitezei de absorbție în țesut [ $\text{g sediment kg}^{-1}$  din vierme  $\text{d}^{-1}$ ]

$k_e$  = constanta vitezei de eliminare [ $\text{d}^{-1}$ ]

Atunci  $k_s/k_e \times C_s$  reprezintă o metodă de obținere a concentrației substanței testate în țesutul de vierme la starea de echilibru ( $C_{a,ss}$ ).

Factorul de acumulare biotă-sediment (BSAF) trebuie calculat astfel:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

unde  $f_{oc}$  este fracțiunea de carbon organic din sediment, iar  $f_{lip}$  este fracțiunea de conținut de lipide din vierme, ambele bazate pe greutatea uscată sau pe greutatea umedă.

Data fiind o serie de timp a valorilor concentrațiilor, cinetica eliminării poate fi modelată folosind următoarele ecuații model și o metodă computerizată de estimare a parametrilor neliniari.

Media măsurată a reziduului corporal la sfârșitul fazei de absorbție este recomandată ca punct de pornire implicit. Valoarea modelată/estimată din faza de absorbție trebuie folosită numai dacă, de exemplu, valoarea măsurată se abate semnificativ de la valoarea reziduului corporal modelat. A se vedea, de asemenea, punctul 50 pentru preexpunerea alternativă a viermilor desemnați pentru eliminare; cu această metodă, eșantioanele din acești viermi preexpuși în ziua 0 a fazei de eliminare se consideră că oferă o valoare realistă a reziduului corporal cu care se începe eliminarea cinetică.

▼ **M6**

Dacă punctele aferente datelor reprezentate grafic în funcție de timp indică o scădere exponențială constantă a concentrației substanței testate în animale, poate fi utilizat un model cu un compartiment (ecuația 4) pentru a descrie evoluția temporală a eliminării.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ecuația 3}]$$

Uneori, procesele de eliminare par a se derula în două etape, indicând o scădere rapidă a  $C_a$  în timpul etapelor timpurii, care se modifică în sensul unei pierderi mai lente de substanțe testate în fazele mai târzii ale eliminării (8) (19) (25). Cele două etape pot fi interpretate plecând de la ipoteza că în organism există două compartimente diferite din care substanța testată se elimină cu viteză diferită. În aceste cazuri, trebuie studiată literatura relevantă (15) (16) (17) (25).

O eliminare din două compartimente este descrisă, de exemplu, prin următoare ecuație (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{-k_b \times t} \quad [\text{ecuația 4}]$$

A și B reprezintă dimensiunea compartimentelor (în procente de reziduu tisular general), unde A este compartimentul cu pierdere rapidă de substanță, iar B compartimentul cu pierdere lentă a substanței testate. Suma A și B este egală cu 100 % din volumul întregului compartiment de animal la starea de echilibru.  $k_a$  și  $k_b$  reprezintă constantele de eliminare corespunzătoare [ $d^{-1}$ ]. Dacă modelul cu două compartimente este aplicat datelor privind depurarea, constanta vitezei de absorbție  $k_s$  poate fi determinată după cum urmează (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [\text{ecuația 5}]$$

Cu toate acestea, aceste ecuații model trebuie folosite cu prudență, în special atunci când în timpul testului au loc modificări ale biodisponibilității substanței testate (42).

Ca alternativă la ecuațiile model descrise mai sus, parametrii cinetici ( $k_s$  și  $k_e$ ) pot fi calculați și într-o singură etapă, aplicând modelul cineticii de ordinul întâi tuturor datelor obținute din faza de absorbție și din cea de eliminare împreună. Pentru o descriere a unei metode care ar putea permite un astfel de calcul combinat al constantelor vitezei de absorbție și de eliminare, pot fi consultate referințele (55), (56) și (57).

Reziduurile neeliminate (NER) trebuie calculate ca parametru studiat secundar prin înmulțirea raportului dintre concentrația medie din viermi ( $C_a$ ) în ziua 10 a fazei de eliminare și concentrația medie din viermi ( $C_a$ ) la starea de echilibru (ziua 28 a fazei de absorbție) cu 100:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ la finalul eliminării (medie)} \times 100}{C_a \text{ la starea de echilibru (medie)}}$$

▼ **M6***Apendicele 3***Exemplu de program de eșantionare pentru un test de bioacumulare de 28 de zile****a) Faza de absorbție (inclusiv o fază de echilibrare de 4 zile)**

| Ziua    | Activități  |
|---------|---|
| – 6     | Pregătirea suspensiei de turbă pentru sediment; condiționarea suspensiei timp de 48 de ore;   |
| – 4     | Adiționarea sedimentului sau a unei părți din sediment; amestecarea tuturor constituenților sedimentului; îndepărtarea eșantioanelor de sediment din sedimentul tratat și din cel de control cu solvent pentru determinarea concentrației substanței de testare; adăugarea de apă acoperitoare; incubarea în condiții de testare (faza de echilibrare);   |
| – 3/– 2 | Separarea organismelor de testare din cultură pentru aclimatizare;  |
| 0       | Măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); îndepărtarea replicilor pentru prelevarea de eșantioane de apă și de sediment pentru determinarea concentrației substanței testate; distribuirea în mod aleatoriu a viermilor în camerele de testare; reținerea unor subeșantioane suficiente de viermi pentru determinarea valorilor analitice de fond; controlarea alimentării cu aer, dacă se utilizează un sistem de testare închis;  |
| 1       | Îndepărtarea replicilor pentru eșantionare; controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor, a calității apei (a se vedea punctul 56); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate;   |
| 2       | Controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii;   |
| 3       | La fel ca în ziua 1;  |
| 4 – 6   | La fel ca în ziua 2;  |
| 7       | La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;   |
| 8 – 13  | La fel ca în ziua 2;  |
| 14      | La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;   |
| 15 – 20 | La fel ca în ziua 2;  |
| 21      | La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;   |
| 22 – 27 | La fel ca în ziua 2;  |
| 28      | La fel ca în ziua 1; măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); sfârșitul fazei de absorbție; reținerea unor subeșantioane suficiente de viermi pentru determinarea valorilor analitice de fond, a greutateii umede și uscate și a conținutului de lipide; transferarea viermilor din replicile expuse rămase în vase care conțin sediment curat pentru faza de eliminare (fără purjare intestinală); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi din vasele de control cu solvent; eșantionarea soluțiilor de captare, dacă sunt instalate. |
|         | Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) trebuie programate ținând cont de proprietățile substanței testate. Dacă este necesar, se condiționează sedimentul preparat sub apa acoperitoare la $20 \pm 2$ °C timp de 7 zile; în acest caz, este necesară prepararea mai timpurie a sedimentului!   |
|         | Activitățile descrise pentru ziua 2 trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).  |

▼ **M6****b) Faza de eliminare**

| Ziua                             | Activități  |
|----------------------------------|---|
| – 6                              | Pregătirea suspensiei de turbă pentru sediment; condiționarea suspensiei timp de 48 de ore;   |
| – 4                              | Amestecarea tuturor constituenților sedimentelor; îndepărtarea eșantioanelor de sediment din sedimentul tratat și din cel de control cu solvent pentru determinarea concentrației substanței de testare; adăugarea de apă acoperitoare; incubarea în condiții de testare;   |
| 0 (ziua 28 a fazei de absorbție) | Măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); transferarea viermilor din replicile expuse rămase în vase care conțin sediment curat; îndepărtarea după <b>4 – 6 ore</b> a replicilor pentru prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate; distribuirea în mod aleatoriu a viermilor în camerele de testare; |
| 1                                | Îndepărtarea replicilor pentru eșantionare; controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor, a calității apei (a se vedea punctul 52); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate;   |
| 2                                | Controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii;   |
| 3                                | La fel ca în ziua 1;  |
| 4                                | La fel ca în ziua 2;  |
| 5                                | La fel ca în ziua 1;  |
| 6                                | La fel ca în ziua 2;  |
| 7                                | La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;   |
| 8 – 9                            | La fel ca în ziua 2;  |
| 10                               | La fel ca în ziua 1; sfârșitul fazei de eliminare; măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi din vasele de control cu solvent; eșantionarea soluțiilor de captare, dacă sunt instalate.   |
|                                  | Prepararea sedimentului înainte de începerea fazei de eliminare trebuie realizată în același mod ca înainte de faza de absorbție.   |
|                                  | Activitățile descrise pentru ziua 2 trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).  |

▼ **M6***Apendicele 4***Câteva caracteristici fizico-chimice ale unei apei de diluție acceptabile**

| CONSTITUENT   | CONCENTRAȚII |
|---|--------------|
| Materie sub formă de particule                              | < 20 mg/l    |
| Carbon organic total  | < 2 µg/l     |
| Amoniac neionizat   | < 1 µg/l     |
| Clor rezidual   | < 10 µg/l    |
| Pesticide organofosforice totale                            | < 50 ng/l    |
| Total pesticide organofosforice plus bifenili policlorurați | < 50 ng/l    |
| Clor organic total  | < 25 ng/l    |

**COMPOZIȚIA APEI RECONSTITUITE RECOMANDATE****(a) Soluție de clorură de calciu**

Se dizolvă 11,76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

**(b) Soluție de sulfat de magneziu**

Se dizolvă 4,93 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

**(c) Soluție de bicarbonat de sodiu**

Se dizolvă 2,59 g de  $\text{NaHCO}_3$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

**(d) Soluție de clorură de potasiu**

Se dizolvă 0,23 g de  $\text{KCl}$  în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

Toate substanțele chimice trebuie să fie de puritate analitică.

Conductivitatea apei distilate sau deionizate nu trebuie să depășească  $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

Se amestecă 25 ml din fiecare dintre soluțiile menționate la litere (a) – (d) și se completează volumul total până la 1 litru cu apă deionizată. Suma ionilor de calciu și de magneziu din aceste soluții este de 2,5 mmol/l.

Proporția de ioni  $\text{Ca}:\text{Mg}$  este de 4:1, iar cea de ioni  $\text{Na}:\text{K}$  este de 10:1. Capacitatea acidă  $\text{K}_{\text{S4.3}}$  a acestei soluții este de 0,8 mmol/l.

Se aerează apa de diluție până la obținerea saturației în oxigen, apoi se depozitează pentru o perioadă de aproximativ două zile fără o altă aerare înainte de utilizare.

pH-ul unei apei de diluție acceptabile trebuie să se încadreze între 6 și 9.

## ▼ M6

## Apendicele 5

**Sedimentul artificial – recomandări privind prepararea și depozitarea**

Spre deosebire de cerințele metodei de testare C.8 (40), se recomandă ca respectivul conținut de turbă din sedimentul artificial să fie de 2 % în loc de 10 % din greutatea uscată, pentru a corespunde unui conținut de carbon organic mic spre mediu în sedimentele naturale (58).

Procentul de constituenți uscați ai sedimentului artificial:

| Constituent        | Caracteristici   | % din sedimentul uscat |
|--------------------|--|------------------------|
| Turbă              | Mușchi de turbă <i>Sphagnum</i> , grad de descompunere: „mediu”, uscat cu aer, fără reziduuri vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor $\leq 0,5$ mm)   | $2 \pm 0,5$            |
| Nisip de cuarț     | Dimensiunea granulelor: $\leq 2$ mm, însă $> 50$ % din particule trebuie să se încadreze în intervalul $50 - 200$ $\mu\text{m}$  | 76                     |
| Argilă de caolinit | Conținut de caolinit $\geq 30$ %   | $22 \pm 1$             |
| Sursa de hrană     | <i>Folia urticae</i> , frunze granulate de <i>Urtica sp.</i> (urzică iritantă), fin măcinată (dimensiunea particulelor $\leq 0,5$ mm) sau un amestec de frunze granulate de <i>Urtica sp.</i> cu alfa-celuloză (1: 1); în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consum uman; în plus față de sedimentul uscat | $0,4 - 0,5$ %          |
| Carbonat de calciu | $\text{CaCO}_3$ , pulverizat, pur din punct de vedere chimic, adăugat la sedimentul uscat  | $0,05 - 1$             |
| Apă deionizată     | Conductivitate $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$ , adăugată la sedimentul uscat   | $30 - 50$              |

În cazul în care se preconizează concentrații mari de amoniac, de exemplu, dacă se știe că substanța testată inhibă nitrificarea, ar putea fi utilă înlocuirea a 50 % din pudra de urzică bogată în azot cu celuloză (de exemplu, pudră de  $\alpha$ -celuloză, pură din punct de vedere chimic, dimensiunea particulelor  $\leq 0,5$  mm).

**Pregătire**

Turba este uscată cu aer și măcinată ca pudră fină (dimensiunea particulelor  $\leq 0,5$  mm, fără reziduuri vizibile de plante). Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pudră de turbă cu ajutorul unei părți de apă deionizată care trebuie adăugată la sedimentul uscat [un volum de apă de  $11,5 \times$  greutate umedă a turbei s-a considerat a fi util pentru a realiza o suspensie de turbă agitatibilă (8)] utilizând un dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță.

pH-ul acestei suspensii este ajustat la  $5,5 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ . Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la  $20 \pm 2$  °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul și se ajustează în intervalul  $6 \pm 0,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Apoi întreaga suspensie se amestecă cu ceilalți constituenți uscați, ținând cont de orice porție utilizată pentru adăugare. Se adaugă apa deionizată rămasă pentru a obține un sediment omogen. Se măsoară din nou pH-ul și se ajustează în intervalul  $6,5 - 7,5$  cu  $\text{CaCO}_3$ , dacă este necesar. Totuși, în cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, poate fi utilă menținerea pH-ului sedimentului sub 7 (de exemplu între 6 și 6,5). Se prelevează eşantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. În cazul în care se preconizează degajare de amoniac, sedimentul artificial poate să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior (de exemplu, raport sediment-apă 1: 4, înălțimea stratului de sediment în vasele de testare) înainte de a fi adăugat cu substanța testată, adică necesită completare cu apă, care trebuie să fie aerată. La finalul perioadei de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Se prelevează eşantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul total de carbon organic (de exemplu, 3 eşantioane).

**▼ M6**

Ulterior, nisipul de cuarț adăugat este amestecat cu sediment pentru fiecare nivel de tratament, sedimentul este distribuit în vasele replică de testare și acoperit cu apă de testare (de exemplu, raport sediment-apă 1: 4, înălțimea stratului de sediment în vasele de testare). Vasele sunt apoi incubate în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior. În acest moment începe perioada de echilibrare. Apa de acoperire trebuie să fie aerată.

Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul adăugării sedimentului cu substanța testată. Ea poate fi amestecată în prealabil cu suspensia de turbă (a se vedea mai sus). Cu toate acestea, degradarea excesivă a sursei de hrană înainte de adăugarea organismelor de testare – de exemplu, în cazul unei perioade lungi de echilibrare – poate fi evitată prin scurtarea cât mai mult posibil a perioadei dintre momentul adăugării hranei și începutul expunerii. Pentru a asigura un contact suficient al hranei cu substanța testată, sursa de hrană trebuie amestecată cu sedimentul cel târziu în ziua adăugării substanței testate în sediment. Se pot face excepții în cazul în care durata perioadei de echilibrare conduce la degradarea microbiană excesivă a hranei înainte de adăugarea organismelor de testare. Se prelevează eşantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și carbonul organic total (de exemplu, 3 eşantioane de sediment adăugat sau de control).

Greutatea uscată a constituenților (turbă, nisip, caolin) trebuie să fie raportată în g și în procente din substanța uscată totală.

Volumul de apă care trebuie adăugat la componentele uscate în timpul preparării sedimentului trebuie, de asemenea, raportat în procente din greutatea uscată totală (de exemplu, 100 % greutate uscată + 46 % apă înseamnă 1 000 g greutate uscată primesc un total de 460 ml de apă, care rezultată în 1 460 g de sediment umed).

**Depozitare**

Constituenții uscați ai sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat umed poate fi depozitat (pentru utilizarea ulterioară numai în cultură) la  $4 \pm 2$  °C, la întuneric, timp de 2 – 4 săptămâni de la ziua preparării (8).

Sedimentul adăugat cu substanța testată trebuie utilizat imediat, exceptând cazul în care există informații care indică faptul că acel sediment poate fi depozitat fără a fi afectate toxicitatea și biodisponibilitatea substanței testate. Eşantioanele de sediment adăugat pot fi depozitate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță testată.

## ▼ M6

## Apendicele 6

## Speciile de oligochete recomandate pentru testarea bioacumulării

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Oligochetele tubificide (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) trăiesc în sedimente de apă dulce în conducte căptușite cu mucus. În aceste conducte, viermii stau cu capul în jos, ingerând particule de sedimente folosind microorganisme asociate și resturi organice. Partea posterioară de obicei se undulează în apa acoperitoare în scopuri de respirație. Deși habitatul acestei specii este reprezentat de o mare varietate de tipuri de sedimente întâlnite în întreaga emisferă nordică, *Tubifex tubifex* preferă particulele de dimensiuni relativ mici (59). Caracterul adecvat al acestei specii pentru testarea ecotoxicologică este descrisă, de exemplu, în referințele (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

*Metode de cultură*

Pentru a avea un număr suficient de exemplare de *Tubifex tubifex* pentru efectuarea testelor de bioacumulare, viermii trebuie păstrați în cultură de laborator permanentă. Pentru cultura *T. tubifex* se recomandă un sistem alcătuit din sediment artificial bazat pe sol artificial conform metodei de testare C.8 (40) și apă reconstituită conform metodei de testare C.1 (8).

Se pot utiliza ca vase de cultură și recipiente din sticlă sau din oțel inoxidabil cu înălțimea cuprinsă între 12 și 20 cm. Fiecare recipient de cultură este încărcat cu un strat de sediment artificial umed preparat astfel cum se descrie în apendicele 5. Adâncimea stratului de sediment trebuie să permită comportament natural de săpare de galerii al viermilor (adâncime minimă de 2 cm pentru *T. tubifex*). Apa reconstituită este adăugată la sistem. Trebuie procedat cu grijă pentru a minimiza perturbarea sedimentului. Întreaga cantitate de apă trebuie ușor aerată (de exemplu, 2 bule pe secundă cu aer filtrat prin sită de 0,45 μm) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului. Temperatura recomandă pentru cultură este de 20 ± 2 °C.

Viermii se adăugă la sistemul de cultură în condițiile unei încărcături maxime de 20 000 de indivizi/m<sup>2</sup> de suprafață a sedimentului. O încărcare mai mare poate duce la o reducere a vitezei de creștere și de reproducere (43).

În culturile de sediment artificial, viermii trebuie să fie hrăniți. Un regim de hrănire constând din hrană de pești măcinată fin, de exemplu TetraMin® poate servi ca nutriție suplimentară (8); Klerks 1994, comunicare personală. Intervalele de hrănire trebuie să permită creștere și reproducere suficiente și trebuie să mențină la un nivel minim acumularea de amoniac și dezvoltarea de ciuperci în cultură. Hrana trebuie administrată de două ori pe zi (de exemplu, 0,6 – 0,8 mg per cm<sup>2</sup> de suprafață a sedimentului). Experiența practică a demonstrat că aplicarea de hrană suspendată și omogenizată în apă deionizată poate facilita distribuția omogenă hranei pe suprafața sedimentului în recipientele de cultură

Pentru a evita orice fel de acumulare de amoniac, apa acoperitoare trebuie schimbată utilizând un sistem cu flux continuu sau, cel puțin o dată pe săptămână, manual. Sedimentul trebuie schimbat la fiecare trei luni în culturile stoc.

Prelevarea de viermi din cultură se poate face prin cernerea sedimentului de cultură printr-o sită de 1 mm în cazul în care sunt necesari doar adulții. Pentru reținerea coconilor e necesară o sită de 0,5 mm, iar pentru viermii tineri, una de 0,25 mm. Sitele pot fi introduse în apă reconstituită după ce sedimentul a fost cernut. Viermii părăsesc sita și pot fi apoi preluați din apă folosind un forceps fin din oțel sau o pipetă cu margini finisate la foc.



## ▼ M6

Numai exemplarele intacte și clar identificate de *Tubifex tubifex* [de exemplu (64)] sunt utilizate pentru a începe un test sau noi culturi. Viermii bolnavi sau lezați, precum și coconii infestați cu hife fungice trebuie eliminați.

O cultură sincronizată poate furniza viermi de o anumită vârstă la intervale adecvate, atunci când se dorește. Noi vase de cultură sunt pregătite la intervalele alese (de exemplu, la fiecare două săptămâni), începând cu animale de o anumită vârstă (de exemplu, coconi). La condițiile de cultură descrise aici, viermii devin adulți după 8 – 10 săptămâni. Culturile pot fi recoltate, în cazul în care viermii au depus noi coconi, de exemplu, după zece săptămâni. Adulții prelevați pot fi utilizați în teste, iar cu coconii se pot iniția noi culturi.

#### ***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

*Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) este, de asemenea, un locuitor al sedimentelor de apă dulce în întreaga lume și este utilizat pe scară largă în testarea ecotoxicologică. Informații cu privire la biologia, condițiile de cultură și la sensibilitatea speciei pot fi obținute din (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* poate fi, de asemenea, cultivat în sedimentul artificial recomandate pentru *T. tubifex* în conformitate cu (8), în anumite limite. Întrucât, în natură, *L. variegatus* preferă sedimente mai aspre decât *T. tubifex* (59), culturile în laborator cu sediment artificial folosit pentru *T. tubifex* pot înceta după 4 – 6 luni. Experiența practică a demonstrat că *L. variegatus* poate fi ținut într-un substrat nisipos (de exemplu, nisip de cuarț, pietriș fin) într-un sistem cu flux continuu utilizând peștele ca sursă de hrană de-a lungul mai multor ani fără a reînnoi substratul. Un avantaj major al *L. variegatus* față de alte specii de oligochete acvatice este reproducerea rapidă, rezultând o biomasă rapid crescătoare în populații cultivate în laborator (1)(6)(9)(10).

#### *Metode de cultură*

Condițiile cultivării *Lumbriculus variegatus* sunt schițate în detaliu în Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Un rezumat al acestor condiții este prezentat în continuare.

Viermii pot fi cultivați în acvarii de mari dimensiuni (57 – 80 l) la o temperatură de 23 °C cu o perioadă de expunere de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric (100 – 1 000 lux) utilizând apă naturală reînnoită zilnic (45 – 50 l per acvariu). Substratul este preparat prin decuparea de fâșii din șervete de hârtie maro nealbită care apoi pot fi amestecate cu apa de cultură timp de câteva secunde pentru a obține mici bucăți de substrat de hârtie. Acest substrat poate fi apoi utilizat direct în acvariul de cultură a *Lumbriculus* prin acoperirea fundului bazinului sau poate fi depozitat congelat în apă deionizată în vederea unei utilizări ulterioare. Noul substrat din bazin va dura în general aproximativ două luni.

Fiecare cultură de viermi începe cu 500 – 1 000 de viermi care sunt hrăniți cu o suspensie de 10 ml conținând 6 g de hrană de pornire pentru păstrăvi de 3 ori pe săptămână, în condiții de reînnoire sau cu flux continuu. În cazul culturilor statice sau semistatice, vitezele de hrănire trebuie reduse pentru a preveni dezvoltarea de bacterii și de ciuperci. Hrana și substratul de hârtie trebuie analizat din punctul de vedere al substanțelor care trebuie folosite în testele de bioacumulare.

În aceste condiții, numărul de exemplare din cultură se dublează în general în aproximativ 10 – 14 zile.

*Lumbriculus variegatus* poate fi extras din culturi, de exemplu, prin transferul substratului într-un pahar de laborator separat cu ajutorul unei plase fine sau al organismelor cu ajutorul unei pipete din sticlă cu gura largă (cu diametrul de aproximativ 5 mm) finisată la foc. În cazul în care substratul este cotransferat în respectivul pahar de laborator, paharul conținând viermi și substrat este lăsat

▼ **M6**

peste noapte în condiții de flux continuu, care vor elimina substratul din pahar, viermii rămânând pe fundul vasului. Aceștia pot fi apoi introduși în bazine de cultură nou pregătite sau prelucrați ulterior pentru test conform descrierii din referințele (1) și (6). A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor pensete din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

Atunci când se utilizează *L. variegatus* în testele de bioacumulare în sediment trebuie acordată atenție modului său de reproducere (fragmentare urmată de regenerare). Acest mod de reproducere asexuată are ca rezultat două fragmente, care nu se hrănesc o anumită perioadă până ce segmentul capului sau al cozii se regenerează [de exemplu, (36), (37)]. Aceasta înseamnă că este posibil ca în cazul *L. variegatus* absorbția de sediment și de contaminanți să nu se realizeze continuu ca în cazul tubificidelor, care nu se reproduc prin fragmentare.

Prin urmare, trebuie realizată o sincronizare pentru reducerea la minimum a reproducerii și a regenerării necontrolate care determină o variație mare a rezultatelor testului. O astfel de variație poate apărea atunci când unele exemplare, care sunt fragmentate și care, în consecință, nu se hrănesc într-o anumită perioadă, sunt expuse mai puțin la substanța testată decât alte exemplare care nu se fragmentează pe parcursul testului, de exemplu (38). Cu 10 – 14 zile înainte de expunere, viermii trebuie să fie fragmentați în mod artificial (sincronizare) (65). Trebuie utilizați viermi mari, care, de preferință, nu prezintă semne de fragmentare recentă. Acești viermi pot fi așezați pe o lamă din sticlă într-o picătură de apă de cultură și disecați cu ajutorul unui bisturiu în regiunea mediană a corpului. Trebuie avut grijă ca extremitățile posterioare să fie de dimensiuni similare. Extremitățile posterioare trebuie apoi lăsate să regenereze capete noi într-un vas de cultură care să conțină același substrat ca cel utilizat în cultură și apă reconstituită, până la începerea perioadei de expunere. Regenerarea de capete noi este indicată în momentul în care viermii sincronizați sapă galerii în substrat (prezența capetelor regenerate poate fi confirmată prin examinarea la un microscop binocular a unui subeșantion reprezentativ). Se preconizează că, ulterior, organismele de testare se află într-o stare fiziologică similară. Aceasta înseamnă că, atunci când are loc regenerarea în cazul viermilor sincronizați pe parcursul testului, se estimează că practic toate animalele sunt expuse în aceeași măsură la sedimentul adiționat. Hrănirea viermilor sincronizați trebuie să se realizeze imediat ce viermii încep să sape galerii în substrat sau după 7 zile de la disecție. Regimul de hrănire trebuie să fie comparabil cu cel al culturilor normale, însă se recomandă hrănirea viermilor sincronizați cu aceeași sursă de hrană ca cea utilizată în cadrul testului. Viermii trebuie ținuti la o temperatură de testare, la  $20 \pm 2$  °C. După regenerare, trebuie utilizați pentru test viermii de dimensiune similară, întregi și intacti care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui stimul mecanic ușor. A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor pensete din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

Când se utilizează *Lumbriculus variegatus* pentru testare, din cauza modului specific de reproducere a acestei specii, o creștere a numărului de viermi trebuie să apară în timpul testului, dacă condițiile sunt corespunzătoare (6). Lipsa reproducerii în cadrul unui test de bioacumulare cu *L. variegatus* trebuie înregistrată și trebuie luată în considerare la interpretarea rezultatelor testelor.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificide, Oligochete (nevalidate în teste interlaboratoare)**

*Branchiura sowerbyi* locuiește într-o varietate de tipuri de sedimente din bazine, lacuri, iazuri și râuri, fiind originară din zonele tropicale. De asemenea, ea poate fi întâlnită și în acumulările de apă caldă din emisfera nordică. Cu toate acestea, ea este mai abundentă în sedimentele cu măr argilos, cu un conținut mare de

## ▼ M6

materie organică. În plus, viermii trăiesc în stratul de sedimente. Chiar și partea posterioară a viermilor este de obicei pătrunsă în galerie. Această specie este ușor de identificat prin filamentele branhiale din partea lor posterioară. Adulții pot ajunge la o lungime de 9 – 11 cm și la o greutate umedă de 40 – 50 mg. Adulții au o rată mare de reproducere, populația dublându-se în mai puțin de 2 săptămâni, în condițiile de temperatură și de hrănire descrise mai jos [Aston et al., 1982, (65)]. *B. sowerbyi* a fost folosită în studiile de toxicitate și de bioacumulare [Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, respectiv (67)].

#### Metode de cultură

Un rezumat al condițiilor de cultură pentru *Branchiura sowerbyi* este oferit mai jos (pus la dispoziție de Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina și Carla J. Roghair, RIVM, Țările de Jos).

Nu este necesară o singură tehnică pentru cultivarea organismelor de testare. Organismele pot fi cultivate folosind sediment natural necontaminat (31). Experiența practică a demonstrat că un mediu alcătuit din sediment natural și nisip îmbunătățește starea viermilor în raport cu sedimentul pur natural (32) (67). Pahare de laborator de 3 l care conține 1 500 ml de sediment/apă, constând în 375 ml de sediment natural necontaminat (aproximativ 10 % carbon organic total; aproximativ 17 % dintre particule  $\leq 63 \mu\text{m}$ ), 375 ml nisip curat (M32) și 750 ml de apă de la robinet reconstituită sau declorurată pot fi utilizate pentru cultură (31) (32) (67). De asemenea, pot fi utilizate prosoape de hârtie ca substrat pentru cultură, însă creșterea populației este mai mică decât în sedimentele naturale. În sistemele semistatice, stratul de apă în paharul de laborator este aerat ușor, iar apa acoperitoare trebuie reînnoită săptămânal.

Fiecare pahar conține la început 25 de viermi tineri. După două luni, viermii mari sunt colectați din sediment cu ajutorul unei pensete și sunt introduși într-un nou pahar cu mediu sediment/apă proaspăt preparat. Paharul vechi conține, de asemenea, coconi și viermi tineri. Până la 400 de viermi tineri per pahar pot fi recoltați în acest mod. Viermii adulți pot fi folosiți pentru reproducere timp de cel puțin un an.

Culturile trebuie menținute la o temperatură de 21 până la 25 °C. Variația temperaturii trebuie menținută sub  $\pm 2$  °C. Perioada necesară pentru dezvoltarea embrionară din ouăle care sunt depuse până când exemplarele tinere părăsesc coconul este de aproximativ trei săptămâni la 25 °C. Producția de ouă obținută per vierme supraviețuitor în cazul *B. sowerbyi* s-a constatat că este între 6,36 (31) și 11,2 (30) în nămol la 25 °C. Numărul de ouă per cocon variază de la 1,8 la 2,8 (66) (69) sau până la 8 (68).

Oxigenul dizolvat, duritatea apei, temperatura și pH-ul trebuie măsurate săptămânal. Hrana pentru pești (de exemplu, TetraMin®) poate fi adăugată sub formă de suspensie de două sau de trei ori pe săptămână *ad libitum*. Viermii pot fi hrăniți și cu salată verde decongelată *ad libitum*.

Un avantaj major al acestei specii este biomasa individuală mare (până la 40 – 50 mg greutate umedă per individ). Prin urmare, această specie poate fi utilizată pentru testarea bioacumulării substanțelor testate nemarcate radioactiv. Poate fi expusă în sistemele utilizate pentru *T. tubifex* sau *L. variegatus* cu un singur individ per replică (11). Totuși, numărul de replici trebuie mărit, cu excepția situației în care sunt folosite camere de testare mai mari (11). De asemenea, criteriul de validitate pentru comportamentul de săpare de galerii trebuie ajustat pentru această specie.

▼ **M6**

## BIBLIOGRAFIE

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Chapter C.13 of this Annex, Bioconcentration Flow Thorough Fish test.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Chapter C.27 of this Annex, Sediment water Chironomid toxicity test using spliked sediment
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

**▼ M6**

- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) The following chapters of this Annex:
  - Chapter A.4, vapour pressure
  - Chapter A.5, Surface tension
  - Chapter A.6, Water solubility
  - Chapter A.8, Partition coefficient, shake flask method
  - Chapter A.24, Partition coefficient, HPLC method
  - Chapter C.7, degradation — abiotic degradation: hydrolysis as a function of pH
  - Chapter C.4 A-F Determination of ready biodegradability
  - Chapter C.19, Estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) on soil and on sewage sludge using high performance liquid chromatography (HPLC)
  - Chapter C.29, Ready biodegradability CO<sub>2</sub> in sealed vessels
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.

▼ **M6**

- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Chapter C.1 of this Annex, Fish, Acute Toxicity Test.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.

▼ **M6**

- (40) Chapter C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.
- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.



▼ **M6**

- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.